

Jairo Montemor Augusto Silva

**HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO DIREITO POR BANDAGEM DA
ARTÉRIA PULMONAR EM RATOS. ESTUDO DAS ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS E GENÉTICAS**

Tese Apresentada à
Universidade Federal São Paulo,
Escola Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2019

Jairo Montemor Augusto Silva

**HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO DIREITO POR BANDAGEM DA
ARTÉRIA PULMONAR EM RATOS. ESTUDO DAS ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS E GENÉTICAS**

Tese Apresentada à
Universidade Federal São Paulo,
Escola Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Orientador:

Prof. Dr. Valdir Ambrósio Moisés

Coorientador:

Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Jairo Montemor Augusto

Hipertrofia do VD por bandagem da artéria pulmonar em ratos: estudo das alterações estruturais, funcionais e genéticas / Jairo Montemor Augusto Silva. - São Paulo, 2019.

vii, 54f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina.

Título em inglês: Hypertrophy of the right ventricle by pulmonary artery banding in rats: study of structural, functional and genetic alterations..

1. Hipertrofia Ventricular Direita. 2. Artéria pulmonar. 3. miocárdio. 4. Ratos Wistar.

Universidade Federal São Paulo
Escola Paulista de Medicina Disciplina de Cardiologia
Programa de Pós Graduação em Cardiologia

Chefe do Departamento:	Prof. Dr. Álvaro Pacheco e Silva Filho
Chefe da Disciplina de Cardiologia:	Prof. Dr. Valdir Ambrósio Moisés
Coordenador da Pós Graduação:	Prof.Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca

Jairo Montemor Augusto Silva

**HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO DIREITO POR BANDAGEM DA
ARTÉRIA PULMONAR EM RATOS. ESTUDO DAS ALTERAÇÕES
ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS E GENÉTICAS**

Presidente da banca:

Prof. Dr Orlando Campos Filho

Banca examinadora:

Prof. Dra. Adriana Castello Costa Girardi

Prof. Dr. Katashi Okoshi

Prof. Dr Rodrigo Bellio de Mattos Barretto

Prof. Dr. David Costa de Souza Le Bihan

Prof. Dra Ingrid Kowatsch

Dedicatória

Aos meus pais e avós, cujas trajetórias me permitiram chegar aqui, especialmente ao Zeca, que sempre inspirou minhas ações e hoje me enche de saudades, e a Biba, minha mãe adorável pelo exemplo de perseverança.

À Solange, que é a Mulher da minha existência, Médica e Mãe dos nossos Filhos, com M maiúsculo em todas as facetas. Pela parceria, cumplicidade e amor, sou imensamente grato.

Aos meus filhos André, Marina e Daniel, que tanto me ensinam com suas existências, vocês me fazem melhor a cada dia, meus lindos!

À Unifesp que na capacidade e dedicação dos seus professores e colaboradores continua a ser o Farol nos mares frequentemente revoltos de nosso país.

"There's more to see than can ever be seen, more to do than can ever be done"
Elton John

"Canta o que não silencia, é onde principia a intuição"
Oswaldo Montenegro

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr Valdir Ambrósio Moisés, cujos esforços foram além da mera orientação. Sua calma, precisão e conhecimentos ofereceram-me importantíssimo suporte nesta longa trajetória.

Ao meu coorientador Prof. Dr Paulo José Ferreira Tucci, que da residência médica em Botucatu até hoje, tem sido a inspiração do Cardiologista e pesquisador que quero ser.

Aos colegas e amigos de Laboratório: o que aprendo com cada um é ímpar e único, muito obrigado. Um agradecimento especial a Ednei Luiz Antônio, que para além das múltiplas qualidades percebidas em sua dedicação ao laboratório, soma-se a de amigo.

Ao Departamento de Patologia da Unifesp, em especial a Prof. Dra Silvia Saiuli M. Ihara, que cedeu espaço, recursos e seu tempo para instruir-me no estudo da histologia do miocárdio.

À instituição Uninove que através do Professor Doutor Jose Antônio Silva Junior, Professor Doutor Andrey Jorge Serra e Doutora Regiane dos Santos Feliciano, colaborou de forma absoluta no desenvolvimento dos experimentos em biologia molecular deste trabalho.

A todos técnicos dos laboratórios da UNIFESP e Uninove que estiveram envolvidos nas diversas fases deste estudo.

A todos os amigos e amigas de todas épocas e horas, cujo incentivo foi sempre primordial. Em especial, agradeço a *Ailton José de Almeida Junior (in memoriam)*, que descobriu que eu seria médico muito antes de me decidir a ser.

À *FAPESP* (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) que financiou parte importante deste trabalho.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Sumário.....	vii-viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas.....	xi-xii
Resumo.....	xiii-xv
Abstract.....	xvi-xviii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- OBJETIVOS.....	5
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1- Animais.....	6
3.2- Desenho experimental.....	6
3.3- Bandagem da artéria pulmonar.....	7
3.4- Ecocardiograma	8
3.4.1- Análises ecocardiográficas.....	9
3.4.1.1- Átrios.....	9
3.4.1.2- Ventrículo Direito.....	10
3.4.1.3- Ventrículo esquerdo.....	11
3.4.1.4- Gradiente de pressão através da bandagem da artéria pulmonar....	13
3.5- Medidas das cavidades direitas em ratos ao ecocardiograma inicial e variabilidade intra e interobservadores.....	14
3.6- Estudo Hemodinâmico	14
3.7- Análises macroscópica e histológica	15
3.7.1- Determinação dos pesos do coração e das câmaras cardíacas.....	16
3.7.2- Teor de água do pulmão e do fígado.....	16
3.7.3- Volume do núcleo dos cardiomiócitos.....	17
3.7.4- Quantificação do colágeno.....	18

3.8- Biologia Molecular	18
3.8.1- Coleta de material biológico para análise da expressão gênica	19
3.8.2- Expressão gênica	19
3.8.3- Extração do RNA	20
3.8.4- Transcrição Reversa	21
3.8.5- Reação de Polimerização em Cadeia	21
3.8.6- PCR “array” quantitativa	22
3.9- Análise estatística	22
4 RESULTADOS	23
4.1- Animais - mortalidade	23
4.2- Percentual de água e pesos total e seco do fígado e do pulmão	23
4.3- Peso das cavidades cardíacas	24
4.4- Volume dos núcleos e quantificação de fibrose	26
4.5- Medidas das cavidades direitas basais em ratos ao ecocardiograma inicial e análise da variabilidade intra e interobservador	28
4.6- Ecocardiograma	31
4.6.1- Parâmetros ecocardiográficos das cavidades direitas	31
4.6.2- Parâmetros ecocardiográficos das cavidades esquerdas	35
4.7- Estudo hemodinâmico invasivo	39
4.8- Expressão de genes no modelo de BAP	42
4.8.1- Análise da expressão gênica do Ventrículo direito	43
4.8.2- Análise da expressão gênica do Ventrículo esquerdo	45
5- DISCUSSÃO	48
6- CONCLUSÃO	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Desenho esquemático do experimento.....	7
Figura 2.Imagem apical 4 câmaras: (A) medida AD; (B) espessura e diâmetro VD.....	9
Figura 3.Imagem apical 4 câmaras: (A) área diastólica; (B) área sistólica VD.....	10
Figura 4.(A) Traçado Doppler fluxo diastólico tricúspide; (B) Doppler tecidual VD.....	11
Figura 5.Traçado modo M VD e VE.....	11
Figura 6.Imagem transversal VE e VD (A) diástole; (B) sístole.....	12
Figura 7.Doppler (A) VEVE; (B) VSVE.....	13
Figura 8.Mapeamento fluxo em cores VSVD (A); Doppler contínuo VSVD em (B).....	13
Figura 9.Curva de pressão e dP/dT VD.....	15
Figura 10.Corte histológico HE VD - animal controle.....	17
Figura 11.Corte histológico picrosirius VD : (A) animal bandado; (B) controle.....	18
Figura 12.Gráficos dos pesos de câmaras cardíacas.....	25
Figura 13.Gráficos dos volumes nucleares e % de fibrose VE e VD.....	28
Figura 14.Gráficos dos dados anatômicos e de função sistólica do VD ao ecocardiograma.....	33
Figura 15.Gráficos dos parâmetros diastólicos VD ao ecocardiograma.....	35
Figura 16.Gráficos dos dados anatômicos VE ao ecocardiograma	37
Figura 17.Gráficos da dimensão do AE e função sistólica VE ao ecocardiograma	37
Figura 18.Gráficos dos parâmetros diastólicos do VE ao ecocardiograma.....	39
Figura 19.Gráficos dos parâmetros hemodinâmicos invasivos VD.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes analisados e seus grupos de ação.....	20
Tabela 2. Pesos e percentual de água do pulmão e do fígado.....	24
Tabela 3. Peso das cavidades cardíacas.....	25
Tabela 4. Volume dos núcleos e Porcentagem de fibrose em VE e VD.....	27
Tabela 5. Dados comparativos dos parâmetros do ecocardiograma nos 54 primeiros e 54 últimos exames	29
Tabela 6. Dados comparativos dos parâmetros do ecocardiograma em dois momentos diferentes pelo mesmo examinador.....	30
Tabela 7. Comparação de medidas do examinador 1 e 2 em 20 animais.....	30
Tabela 8. Dados anatômicos e de função sistólica do VD ao ecocardiograma.....	32
Tabela 9. Parâmetros diastólicos do VD ao ecocardiograma.....	34
Tabela 10. Dados anatômicos do VE ao ecocardiograma.....	36
Tabela 11. Parâmetros diastólicos do VE ao ecocardiograma.....	38
Tabela 12. Parâmetros hemodinâmicos invasivos do VD.....	40
Tabela 13. Parâmetros hemodinâmicos invasivos do VE.....	42
Tabela 14. Descrição da expressão de genes no VD.....	44
Tabela 15. Genes superexpressos no VD.....	45
Tabela 16. Descrição da expressão de genes no VE.....	46
Tabela 17. Genes superexpressos no VE.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

Ad	Área diastólica
AD	Átrio direito
AdVD	Área diastólica VD
ANOVA	Análise de variância
As	Área sistólica
AsAD	Área sistólica do átrio direito
BAP	Bandagem da artéria pulmonar
CA	Califórnia
D	diâmetro maior
d	diâmetro menor
Dd VD	Diâmetro diastólico basal do VD
dP/dT	Primeira derivada temporal de pressão positiva
-dP/dT	Primeira derivada temporal de pressão negativa
Ep VD	Espessura parede do VD
ESAT	Excursão sistólica do anel tricúspide
et al	e outros
FEA	Fração de encurtamento
HE	Hematoxilina eosina
hs	Horas
IC	Insuficiência cardíaca
Mass	Massachusetts
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PdVE	Pressão diastólica do ventrículo esquerdo
PdfVE	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PS	Peso seco
Ps	Picrosirius
PSVE	Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
PU	Peso úmido
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Reação de transcriptase reversa
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
USA	Estados Unidos da América
V	Volume
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo esquerdo
VSVE	Via de saída do ventrículo esquerdo

SÍMBOLOS

cm	Centímetros
mg	Miligrama
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
Kg	Quilograma
μm^2	Milemicra ao quadrado

Resumo

Introdução: O remodelamento do VD com consequente comprometimento funcional pode ocorrer em algumas condições clínicas em adultos e crianças. Os fatores desencadeadores, os mecanismos moleculares e a evolução não são ainda bem conhecidos. Também são pouco conhecidas as alterações do ventrículo esquerdo associadas com o remodelamento do VD.

Objetivos: 1. Avaliar os parâmetros morfológicos, funcionais e de expressão gênica do ventrículo direito em ratos submetidos à bandagem da artéria pulmonar e a evolução temporal destes parâmetros. 2. Analisar a influência do remodelamento do ventrículo direito com BAP na geometria, histologia, expressão gênica e desempenho funcional do ventrículo esquerdo.

Métodos:

Foram incluídos ratos Wistar-EPM machos saudáveis com 6 semanas de vida e peso entre 170 e 200 gramas. Um dia após a realização do ecocardiograma os animais foram submetidos ao procedimento para BAP ou não (controle) e depois aleatoriamente divididos em subgrupos conforme o tempo de seguimento: 72 horas, 2, 4, 6 ou 8 semanas. Em cada subgrupo foram realizados: novo ecocardiograma, estudo hemodinâmico e coleta de material para análise morfológica (hipertrofia e fibrose) e de biologia molecular (expressão gênica). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média; a comparação das variáveis entre os subgrupos e tempos de evolução foi feita com ANOVA duas vias e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados: Não houve diferença significativa entre os subgrupos no percentual de água no pulmão e no fígado (pulmão variou 76% a 78% e fígado de 67% a 71%). O peso das câmaras direitas foi significativamente maior nos animais com BAP em todos os subgrupos (VD BAP de 0,34 a 0,48 g e os controles de 0,17 a 0,20 g; AD com BAP de 0,09 a 0,14 g e nos controles de 0,02 a 0,03 g). No VD dos animais com BAP houve

aumento significativo do volume nuclear dos miócitos ($97 \mu\text{m}^3$ a $183,6 \mu\text{m}^3$) comparado com controles ($34,2 \mu\text{m}^3$ a $57,2 \mu\text{m}^3$), mais intensos nos subgrupos de menor exposição à BAP, e do percentual de fibrose (5,9% a 10,4% vs 0,96% a 1,18%), mais alto quanto maior o tempo de BAP. Ao ecocardiograma houve também aumento significativo da espessura miocárdica em todos os grupos com BAP (0,09 a 0,11 cm em relação aos controles- 0,04 a 0,05cm), mas sem variação do diâmetro diastólico do VD ao ecocardiograma. De 2 a 8 semanas de BAP a onda S' e de 0,031 cm/s a 0,040 cm/s) e a VPAVD (51% a 56 %), parâmetros de função sistólica do VD, foram significativamente menores em relação aos respectivos controles (0,040 cm/s a 0,050cm/s; e 61% a 67%). Foi observado no VD maior expressão de genes relacionados a hipertrofia e a matriz extracelular nos subgrupos iniciais e dos genes de apoptose nos subgrupos de maior tempo de BAP.

O peso do VE não foi diferente entre os animais com ou sem BAP. O volume nuclear dos animais com BAP foram maiores que os controles ($74 \mu\text{m}^3$ a $136 \mu\text{m}^3$; de $40,8 \mu\text{m}^3$ a $46,9 \mu\text{m}^3$). O percentual de fibrose foi significativamente maior nos grupos com 4 e 8 semanas de BAP (1,2 e 2,2%) em relação aos controles (0,4 e 0,7%). Ao ecocardiograma o diâmetro diastólico e a espessura miocárdica do VE não foram diferentes entre os animais com BAP e controles. As medidas do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de desaceleração da onda E ao ecocardiograma foram diferentes entre animais com BAP e controles em todos os subgrupos, mas não houve alterações da função diastólica ao estudo hemodinâmico. Houve também aumento da expressão de genes relacionados a diversas funções, em particular de hipertrofia.

Conclusão:

- 1) Ratos submetidos a BAP apresentaram remodelamento do VD compatível com hipertrofia. Estas alterações foram mediadas por aumento da expressão de diversos genes e acompanhada de alterações funcionais; coincidentes com o surgimento de fibrose.
- 2) As variáveis estruturais do VD como peso, espessura miocárdica, volume nuclear do miócito e grau de fibrose, modificaram-se conforme o tempo de exposição à BAP e tiveram relação com variações na expressão gênica, destacando a mudança de padrão alfa para beta dos tempos iniciais para os mais tardios.
- 3) o estudo sugere que o VE desenvolveu alterações histológicas acompanhadas de modificações de expressão gênica simultâneas às alterações encontradas no VD.

Abstract

Introduction:

Right ventricular remodeling with consequent functional impairment may occur in some clinical conditions in adults and children. The triggering factors, the molecular mechanisms and the evolution are not yet well known. Left ventricular changes associated with right ventricular remodeling are also poorly understood.

Objectives:

Evaluate RV morphological, functional and gene expression parameters in rats submitted to pulmonary artery banding compared to control rats, as well as the temporal evolution of these parameters.

- Analyze the influence of RV remodeling with pulmonary artery banding in rats and their controls on LV geometry, histology, gene expression and functional performance.

Methods:

Healthy 6-week-old male Wistar-EPM rats weighing 170 to 200 grams were included. One day after the echocardiogram, the animals underwent the procedure for BAP or not (control) and then randomly divided into subgroups according to the follow-up time: 72 hours, 2, 4, 6 or 8 weeks. In each subgroup were performed: new echocardiogram, hemodynamic study, collection of material for morphological analysis (hypertrophy and fibrosis) and molecular biology (gene expression). Results were presented as mean \pm standard deviation of the mean. The comparison between variables of the subgroups and evolution times was made with two-way ANOVA and Tukey post-test. The adopted significance level was 5%.

Results:

There was no significant difference between subgroups in the percentage of water in the lung and liver (lung ranged from 76% to 78% and liver from 67% to 71%).

The weight of the right chambers was significantly higher in animals with BAP in all subgroups (RV BAP from 0.34 to 0.48 g and controls from 0.17 to 0.20 g, AD with BAP

from 0.09 to 0.14 g and controls from 0.02 to 0.03 g). In the RV of animals with BAP, there was a significant increase in myocyte nuclear volume ($97 \mu\text{m}^3$ to $183.6 \mu\text{m}^3$) compared to controls ($34.2 \mu\text{m}^3$ to $57.2 \mu\text{m}^3$), which were more intense in subgroups with lower exposure to BAP; and fibrosis percentage (5.9% to 10.4% vs 0.96% to 1.18%) was as higher as the BAP time was longer. At echocardiography there was also a significant increase in myocardial thickness in all groups with BAP (0.09 to 0.11 cm compared to controls- 0.04 to 0.05 cm), but without variation in RV diastolic diameter at echocardiography. From 2 to 8 weeks of BAP, the S 'wave (0.031 cm/s and 0.040 cm/s) and VPAVD (51% to 56%), RV systolic function parameters, were significantly lower than the respective controls (0,040 cm/s a 0,050cm/s; and 61% to 67%). Furthermore, higher expression of genes related to hypertrophy and extracellular matrix in the initial subgroups and apoptosis genes in the longer time subgroups of BAP were observed in RV.

On the other hand, LV weight was not different between animals with or without BAP. The nuclear volume of the animals with BAP was larger than the controls ($74 \mu\text{m}^3$ to $136 \mu\text{m}^3$; from $40.8 \mu\text{m}^3$ to $46.9 \mu\text{m}^3$); and the percentage of fibrosis was significantly higher in the 4- and 8-week BAP groups (1.2 and 2.2%) compared to the controls (0.4 and 0.7%). On echocardiography, the diastolic diameter and LV myocardial thickness were not different between animals with BAP and controls. Measurements of isovolumetric relaxation time and E-wave deceleration time on echocardiography were different between animals with BAP and controls in all subgroups, but there were no changes in diastolic function at hemodynamic study. There was also increased expression of genes related to various functions, in particular hypertrophy.

Conclusion:

- 1) Rats submitted to pulmonary artery banding presented remodeling of RV compatible with hypertrophy. These alterations were mediated by increased expression of several genes and accompanied by functional alterations; coincident with the onset fibrosis.
- 2) Structural changes of the RV such as weight, myocardial thickness, myocyte nuclear volume and degree of fibrosis were modified according to the time of exposure to pulmonary artery banding and were related to variations in gene expression; Highlighting the change from alpha to beta pattern from early to late times.
- 3) The study suggests that the left ventricle developed histological alterations accompanied by modifications of gene expression simultaneously to the alterations found in the right ventricle.

1- INTRODUÇÃO

A sobrecarga de pressão do ventrículo direito (VD) pode ocorrer em algumas doenças cardíacas congênitas como as que se associam com obstruções da região infundibular, da valva pulmonar, do tronco e ramos pulmonares (1), e no aumento da pressão pulmonar decorrente das disfunções avançadas do ventrículo esquerdo, nas doenças da valva mitral, da doença pulmonar obstrutiva crônica e na hipertensão arterial pulmonar (2,3). Nas situações com discreto ou moderado aumento da pressão sistólica do VD a repercussão não é usualmente significativa no curto prazo, porém, no longo prazo alterações expressivas podem ocorrer. Nas situações com aumento expressivo da pressão sistólica do VD o processo de remodelamento pode ser mais rápido e chegar a estágios tardios de difícil recuperação do desempenho funcional da câmara (3-6).

O remodelamento do VD ocorre devido à necessidade de gerar maior força para superar a obstrução no trato de saída ou o aumento da pressão pulmonar. Há replicação dos sarcômeros em paralelo que determina aumento da massa ventricular e diminui o estresse parietal (Lei de Laplace) que compensa a demanda pressórica aumentada e permite a estabilização inicial da função cardíaca. Entretanto, se o remodelamento for insuficiente ou o grau da sobrecarga ultrapassar a capacidade de hipertrofia miocárdica, ocorre um desequilíbrio na pós-carga que determina dilatação e disfunção. Essas mudanças são progressivas e deletérias determinando evolução desfavorável do VD, que ao final ficará impossibilitado de gerar maior pressão e manter o débito com conseqüente desenvolvimento de insuficiência cardíaca (IC) (6,7).

O remodelamento do VD assim como o do ventrículo esquerdo (VE) resulta de mecanismos intracelulares de ativação e repressão de genes que codificam certas proteínas (8-10). O remodelamento inclui hipertrofia do miócito, necrose e apoptose, modificações no colágeno e fibrose intersticial e tem sido estudado em modelos animais (8,9,11,12). Diversos genes e proteínas envolvidos têm sido identificados e estas informações podem ser relacionadas com os parâmetros anatômicos e funcionais aferidos pela ecocardiografia e estudo hemodinâmico em diferentes fases do remodelamento (9-14).

O remodelamento do VE tem sido muito mais estudado que o do VD. A maioria é de modelos animais em ratos e camundongos. Os modelos mais usados envolvem produção de fistulas aorto-cava, obstruções na aorta, insuficiência da valva aórtica, infarto do miocárdio por oclusão da artéria coronária esquerda, (15,16,17) ou ainda com medicamentos cardiotóxicos como a doxorrubicina (18). Nestes modelos têm sido analisados aspectos morfológicos e funcionais e aspectos de biologia molecular e expressão gênica (19-22). Com a ecocardiografia Doppler obtém-se dados das dimensões de cavidades, espessura miocárdica, função sistólica e diastólica, além de outros parâmetros hemodinâmicos “in vivo” sob anestesia e sem o sacrifício do animal, o que facilita o seguimento (22-25).

Os modelos animais para estudar o remodelamento do VD visam aumentar a pós-carga por meio de obstrução parcial (bandagem) da artéria pulmonar ou aumento da pressão pulmonar causada por monocrotalina, hipóxia ou DPOC via inalação de fumaça de cigarro com infecções repetidas (3,12,26,27). Aparentemente, tipos diferentes de hipertrofia podem ocorrer nos modelos, dependendo se há sobrecarga de pressão, volume ou associação de pressão e volume (28). Entretanto, os modelos que utilizam substâncias para produzir alterações pulmonares com consequente hipertrofia do VD podem causar modificações em outros órgãos independentes da repercussão cardíaca decorrente do remodelamento do VD (29). Este comprometimento impõe limitações particularmente se o interesse for estudar insuficiência cardíaca. O modelo de cerclagem ou constrição parcial do tronco da artéria pulmonar parece o mais adequado. O grau de hipertrofia parece ter relação com a gravidade da obstrução e as alterações histológicas mais acentuadas parecem ocorrer nas obstruções mais prolongadas (10, 28).

Alguns estudos com modelos variáveis de sobrecarga do VD demonstraram que o aumento na produção de colágeno e fibrose determina aumento equivalente na síntese de moléculas de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar danos oxidativos às mitocôndrias (27). Em paralelo há elevação na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo, na produção de energia pelas mitocôndrias, no desenvolvimento da hipertrofia, na regulação da cinética do cálcio e do fósforo (27). Por outro lado, há ativação de vias de apoptose relacionadas às mitocôndrias o que pode favorecer a disfunção ventricular (10, 12). Outro dado que sugere adaptação ventricular

desfavorável é o aumento da expressão em genes fetais devido a ativação de fatores de transcrição do núcleo como Nfat ou da calcitonina N Receptor-Like Receptor 1 ou calcimodulina que são dependentes da proteína quinase CaMK ou mitogênio quinase MAPK (29, 30). Contrário a outros estudos, alguns autores relatam que a sobrecarga pressórica isolada não seria suficiente para causar insuficiência cardíaca (41, 42). Modelos com sobrecarga pressórica isolada teriam menores taxas de mortalidade e de desenvolvimento de falência cardíaca em relação aos modelos que mimetizam hipertensão pulmonar. Nestes modelos há angioproliferação pulmonar e níveis maiores de fibrose no VD com diminuição da densidade capilar e aumento do estresse oxidativo (41).

A análise da expressão gênica na sobrecarga do VD, independente do modelo, pode ser realizada por técnicas de microarranjos (“microarrays”) de RNA para produzir o mapeamento genético. A técnica é mais trabalhosa e complexa para análise e requer confirmação posterior dos resultados obtidos pela técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) quantitativo e este processo encarece as análises (12, 14, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37). Outra possibilidade é usar ensaios por RT-PCR quantitativo (reação da transcriptase reversa-PCR) que podem identificar múltiplos genes alvo (3, 37). Embora esta técnica não permita análise ampla da expressão gênica como a técnica de microarranjos, as limitações podem ser superadas pela escolha adequada dos genes a serem estudados. Os dados disponíveis na literatura não permitem determinar de forma consistente a relação evolutiva entre a expressão gênica e os aspectos morfológicos, histológicos e funcionais do VD. O conhecimento desta relação poderá colaborar no entendimento de como as alterações de expressão gênica induzem às diferentes fases do remodelamento ventricular direito.

O ecocardiograma com Doppler tem sido usado mais recentemente nos modelos animais de hipertrofia do VD (3, 24, 38, 39, 40). As variáveis mais utilizadas são as áreas sistólica e diastólica da cavidade como indicadores de dilatação e função sistólica (28,39). Estudos também demonstraram que o gradiente de pressão pelo Doppler através da BAP tem relação com a pressão do VD (3). Outras variáveis possíveis de serem avaliadas com ecocardiografia como a espessura da parede do VD e índices de função sistólica e diastólica não foram analisadas nos estudos já publicados (24, 25, 38).

É conhecido que ambos os ventrículos têm características comuns e dependentes como ativação elétrica, hemodinâmicas e humorais. Estas características comuns permitem o melhor desempenho cardíaco possível (3-6). Enquanto a repercussão das disfunções do VE no remodelamento do VD é relativamente conhecida, há ainda poucos dados sobre os efeitos das alterações do VD na estrutura e função do VE. Com ressonância magnética em humanos com doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema pulmonar foi possível demonstrar que a fração de ejeção do VE era menor em relação aos controles (45, 46). Foram também observadas alterações diastólicas do VE em cães com enfisema pulmonar (47)

Como descrito há uma variedade de fatores que podem influenciar os aspectos morfológicos, funcionais e celulares que caracterizam o remodelamento do VD com sobrecarga pressórica e suas consequências ao VE. Supomos que um estudo em modelo animal controlado permitiria uma análise mais adequada dos fatores envolvidos.

2- OBJETIVOS

Em função dos aspectos acima descritos os objetivos do presente estudo foram:

- ✓ Avaliar no ventrículo direito parâmetros morfológicos, funcionais e de expressão gênica em ratos submetidos à bandagem da artéria pulmonar e comparar a evolução temporal destes parâmetros.
- ✓ Analisar a influência do remodelamento do ventrículo direito com bandagem da artéria pulmonar em ratos sobre a geometria, histologia, expressão gênica e desempenho funcional do ventrículo esquerdo.

3- MÉTODOS

3.1- Animais

Foram incluídos ratos machos Wistar-EPM, sem doenças, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais deveriam ter 6 semanas de vida e peso entre 170 e 200 gramas, foram mantidos em caixas com água e ração “ad libitum” em ambiente com temperatura controlada em torno de 22°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. A serragem das caixas foi trocada a cada 48 horas e verificada a integridade dos animais, da água e da ração. O tamanho da amostra do estudo foi definido de forma semelhante a estudos prévios e aplicação de análise de variância (ANOVA) com poder do teste de 80% e nível alfa de 0,05 (8,9). Conforme a proposta do estudo, a análise resultou em uma amostra mínima de 80 animais com taxa de mortalidade de 30% conforme a média de procedimentos semelhantes em experimentos prévios de nosso laboratório.

3.2- Desenho experimental

Inicialmente os animais foram submetidos ao ecocardiograma com Doppler e depois ao procedimento cirúrgico com toracotomia para BAP ou não de forma aleatória. Os que não sofreram a BAP formaram o grupo controle e os demais formaram o grupo com BAP. No 3º dia após o procedimento os animais de ambos os grupos foram aleatoriamente randomizados em 5 subgrupos conforme o tempo de seguimento: 72 horas, 2, 4, 6 e 8 semanas de tal forma que cada subgrupo tinha animais controles e com bandagem (Figura 1); os períodos de análise foram escolhidos por representar a infância e adolescência dos animais; com 8 semanas são adultos jovens. Na data determinada para o fechamento de cada subgrupo, foi realizado novo ecocardiograma, seguido de estudo hemodinâmico e coleta de material para análises histológicas e de biologia molecular (Figura 1).

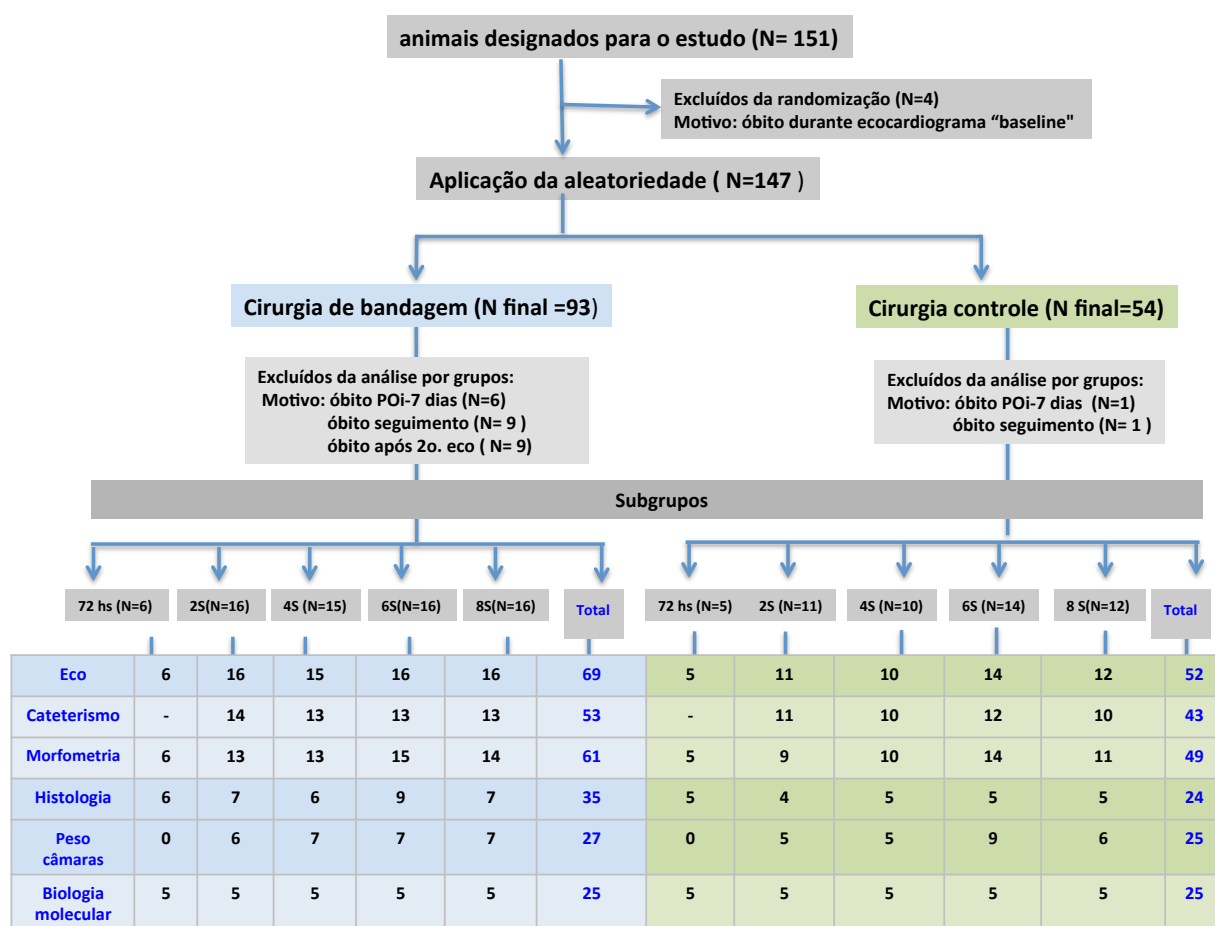


Figura 1. Desenho esquemático dos procedimentos, das ocorrências e da distribuição dos animais do estudo nos grupos com BAP e controles, e respectivos subgrupos de evolução; N= número, POI: pós-operatório imediato; S: semanas

3.3- Bandagem da artéria pulmonar (BAP)

O método da BAP nos animais seguiu o utilizado por Rockman et al (9). Os animais foram anestesiados com halotano, colocados em decúbito dorsal, intubados e mantidos em ventilação mecânica com pressão positiva em ventilador para roedores (modelo Harvard 683, Holliston, MA, USA). Após tricotomia do hemitórax esquerdo, foi realizada incisão na pele, utilizando-se pinça e tesoura, na linha axilar média, um dedo abaixo da axila. Com auxílio de tesoura curva os músculos peitorais foram afastados e com uma pinça hemostática foram divulsionados os músculos intercostais; neste momento foram colocados dois afastadores cirúrgicos tipo "Stevenson" no espaço

intercostal para afastar as costelas e ampliar a toracotomia. A pata dianteira esquerda do animal foi liberada da posição original de decúbito dorsal e fixada junto à pata dianteira direita para posicionar o tórax em decúbito lateral direito (30°), favorecendo a exposição da base do coração. Após separação da aorta o tronco da artéria pulmonar foi laçado com fio de algodão junto com um cateter de 1,3 mm posicionado em paralelo. Este cateter foi retirado após fixação do laço. Após isto, com o coração em sua posição original era realizada hiperinsuflação pulmonar com concomitante fechamento da toracotomia por sutura em bolsa previamente preparada em torno da incisão. Após este procedimento o animal era mantido em ventilação mecânica enriquecida com oxigênio até que ocorresse ventilação espontânea. Após estabilização respiratória o suporte ventilatório era retirado e o animal colocado em caixa plástica aquecida durante o período pós-operatório até a recuperação pós-anestésica completa sob supervisão. Os animais controles (cirurgia simulada) foram submetidos aos mesmos procedimentos exceto a fixação do laço no tronco da artéria pulmonar.

3.4 Ecocardiograma

Um ecocardiograma com Doppler completo foi realizado em todos os animais do estudo antes da randomização. Um segundo ecocardiograma, também completo, foi realizado em todos os animais ao final de cada período de observação, conforme a randomização de 72 horas ou 2, 4, 6, e 8 semanas. A anestesia dos animais para o ecocardiograma foi feita com uma mistura de cloridato de cetamina (50 mg/kg) e cloridato de xilazina (10 mg/kg) seguida de tricotomia da face anterior e lateral esquerda do tórax. Os animais eram posicionados em decúbito lateral esquerdo e três eletrodos foram colocados nas patas para obtenção do traçado eletrocardiográfico simultâneo à imagem ecocardiográfica. O exame foi realizado segundo técnica já consolidada em nosso laboratório com aparelho Philips modelo SONOS 5500® HP (Philips Medical System, Andover, Mass. USA) com transdutor de 5 a 12 MHz que permite a obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos bidimensional e unidimensional (modo M) (22,23) e análise com as diferentes técnicas de Doppler. As imagens foram obtidas pelas janelas paraesternal com os cortes (transversal e longitudinal) e apical quatro e cinco

câmaras. O exame foi completado com análise da velocidade de fluxo por mapeamento de fluxo em cores, Doppler espectral e contínuo, e Doppler tecidual. As imagens foram gravadas em fitas de vídeo para posterior mensuração e análise dos parâmetros anatômicos e funcionais.

3.4.1- Análises ecocardiográficas

Para análise morfológica e funcional do coração foram realizadas várias medidas e calculados diversos parâmetros conforme experiência prévia de nosso laboratório e de diretrizes internacionais com adaptações para os animais do presente estudo (12,19,21,22,23,24,25,38).

3.4.1.1- Átrios

O tamanho do átrio esquerdo foi avaliado pelo diâmetro sistólico anteroposterior medido no plano paraesternal longitudinal na imagem bidimensional ou preferencialmente no traçado em modo M, expresso em mm. O tamanho do átrio direito foi avaliado pela área sistólica medida no plano apical 4-câmaras com a planimetria e expressa em cm^2 (Figura 2).

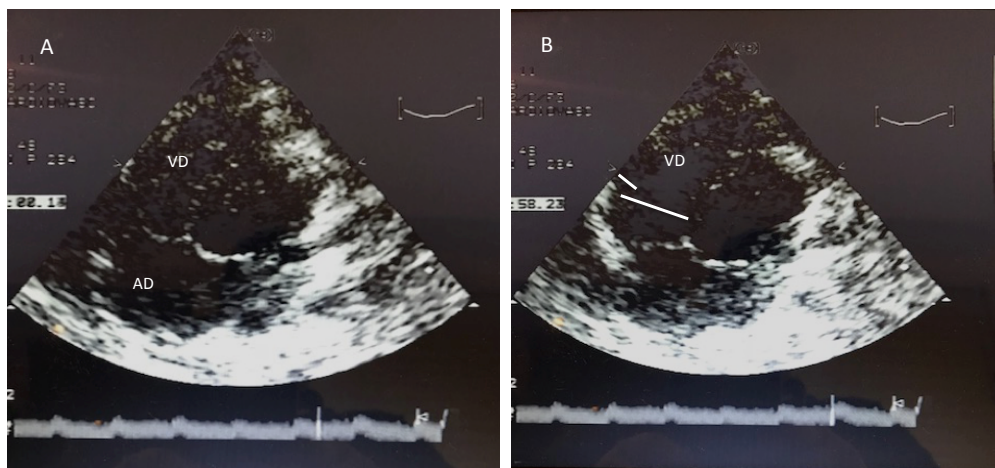


Figura 2. imagem apical que demonstra as 4 cavidades cardíacas; em sístole (A) utilizada para medida do átrio direito; B: em diástole para medida da espessura e do diâmetro diastólico do VD

3.4.1.2- Ventrículo direito

Na imagem apical quatro-câmaras foram medidos o diâmetro diastólico transversal basal (em mm) como a distância do septo à parede lateral e também a espessura diastólica da parede livre (figura 2 B). Para a análise da função sistólica foram obtidos três parâmetros: fração de encurtamento da área, excursão sistólica do anel tricúspide e velocidade de deslocamento do anel tricúspide. A fração de encurtamento (FEA) como $Ad-As/Ad \times 100$ (Figura 3), expressa em porcentagem (%) com base nas medidas das áreas diastólica (Ad) e sistólica (As) no plano longitudinal 4-câmaras. A excursão sistólica do anel lateral da valva tricúspide (ESAT) em direção ao ápice foi obtida na imagem apical 4-câmaras com o feixe de ultrassom do modo M alinhado paralelo à parede livre do VD e perpendicular ao plano lateral do anel da valva tricúspide; a excursão sistólica do anel tricúspide foi medida como a distância da base ao pico da excursão.

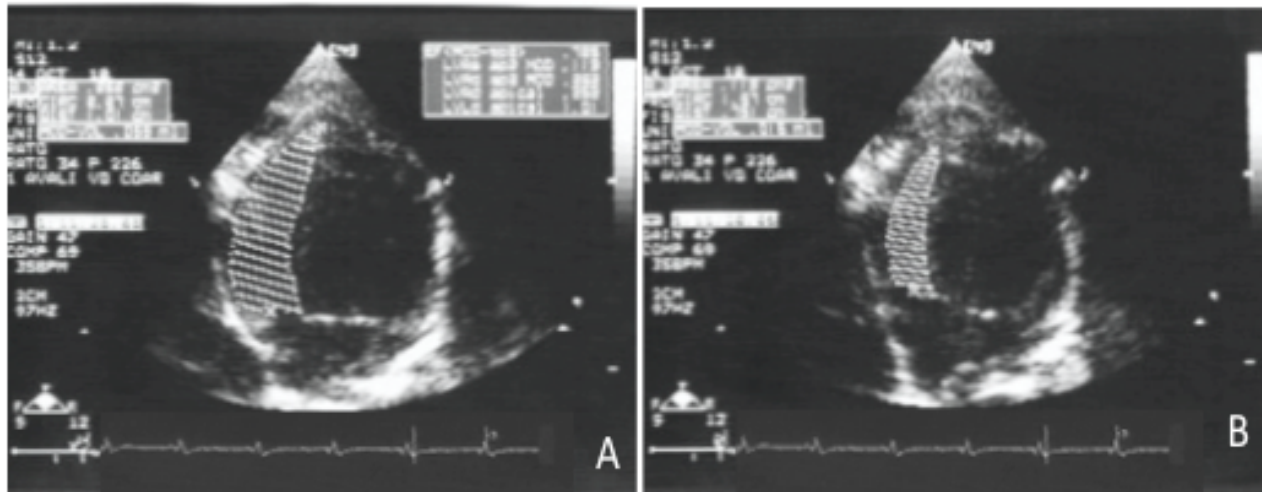


Figura 3. Imagem no plano apical 4-câmaras demonstrando a medida da área diastólica (A) e sistólica (B) usadas para o cálculo da variação percentual da área do VD.

Para a análise da função diastólica do VD, na curva de velocidade do fluxo diastólico tricúspide foram medidas as ondas E e A (em cm/s) (Figura 4A). Com o Doppler tecidual foi medida a velocidade diastólica inicial do anel tricúspide (onda S, em

cm/s) na imagem do plano apical e a amostra de volume posicionada no anel tricúspide lateral (Figura 4 B). na sequência com o doppler tecidual medimos onda e' (em cm/s); com estas medidas foram calculadas as relações E/A e E/e'.

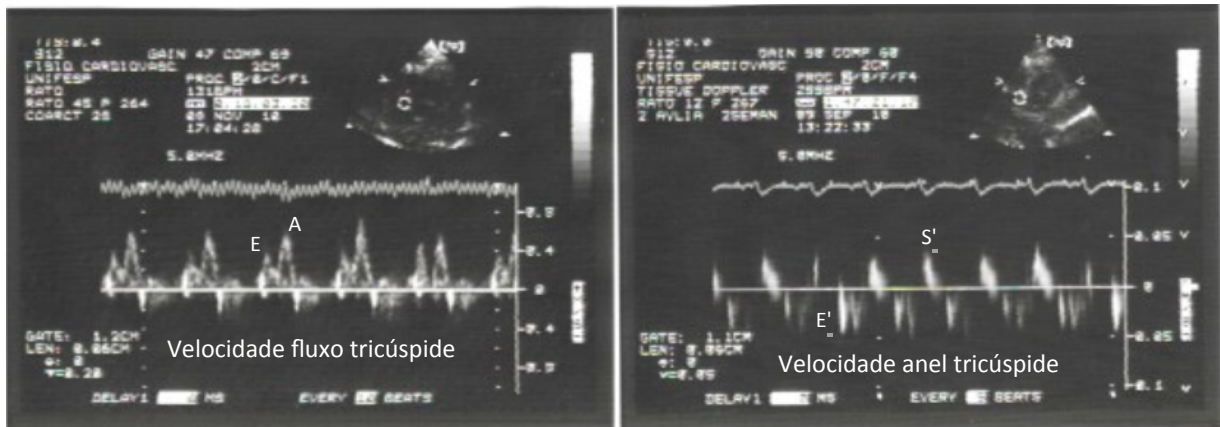


Figura 4. Em A o traçado de velocidade do fluxo diastólico tricúspide com Doppler pulsátil que demonstra as ondas E e A. Em B traçado da velocidade do deslocamento do anel lateral da valva tricúspide; observe a onda diastólica inicial E' e a onda sistólica S' usada como índice de função sistólica.

3.4.1.3- Ventrículo Esquerdo

No plano paraesternal transversal ou longitudinal foram medidos os diâmetros diastólico e sistólico e as espessuras diastólicas do septo interventricular e da parede posterior do VE, preferencialmente no traçado em modo M, ou na imagem bidimensional (figura 5). A função sistólica foi determinada pelo cálculo da fração de encurtamento da área transversa ($FEA = \frac{Ad - As}{Ad}$); para isto foram obtidas as áreas seccionais em diástole (Ad) e sístole (As) no plano transversal na região média da cavidade (figura 6).

Figura 6. Imagem ecocardiográfica obtida no plano paraesternal transversal na região média dos ventrículos direito e esquerdo de animal submetido à BAP. As linhas pontilhadas demonstram a área sistólica do VE em A e diastólica em B. Notar também a dilatação e o aumento da espessura da parede livre do VD com posicionamento retificado do septo ventricular.

A função diastólica foi analisada, inicialmente, na curva de velocidade do fluxo diastólico mitral, obtida com Doppler pulsátil no plano apical quatro-câmaras com a amostra de volume posicionada na face ventricular da valva mitral. Nesta curva foram medidas a velocidade máxima da onda E (enchimento inicial) e a da contração atrial (onda A) e calculada a relação E/A (figura 7A), e o tempo de desaceleração da onda E. Com a amostra de volume do Doppler pulsátil posicionada entre a via de entrada e a via de saída do VE foi obtida a curva de velocidade do fluxo simultâneo nas duas regiões para medida do TRIV (Figura 7B).

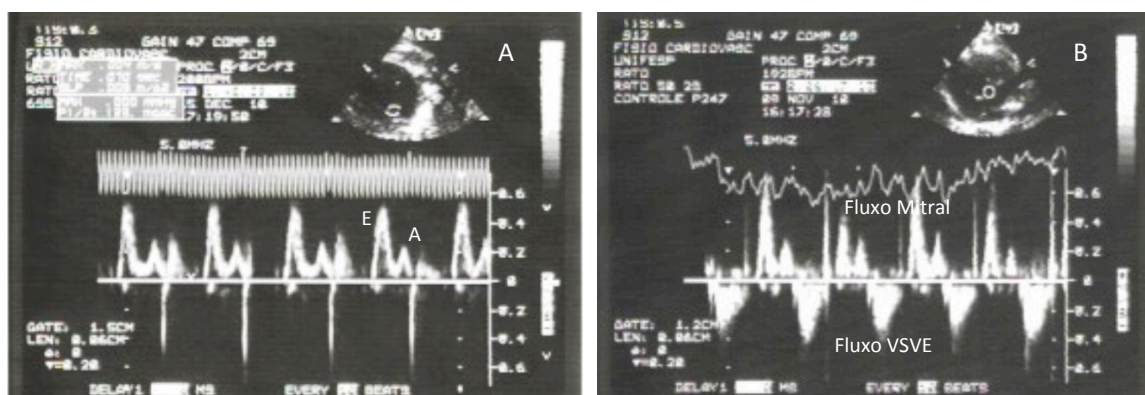


Figura 7. A: curva de velocidade do fluxo diastólico mitral obtida com Doppler pulsátil na via de entrada do VE (corte apical 4 câmaras) para medida das ondas E e A; B: curva de fluxo obtida entre as vias de entrada e saída do VE (VSVE) para medida do tempo de relaxamento isovolumétrico.

3.4.1.4- Gradiente de pressão através bandagem da artéria pulmonar

Foi analisado com a medida da velocidade do fluxo sistólico através da BAP com Doppler contínuo (Figura 8); o feixe de ultrassom do Doppler contínuo foi orientado com a imagem bidimensional e por mapeamento de fluxo em cores.

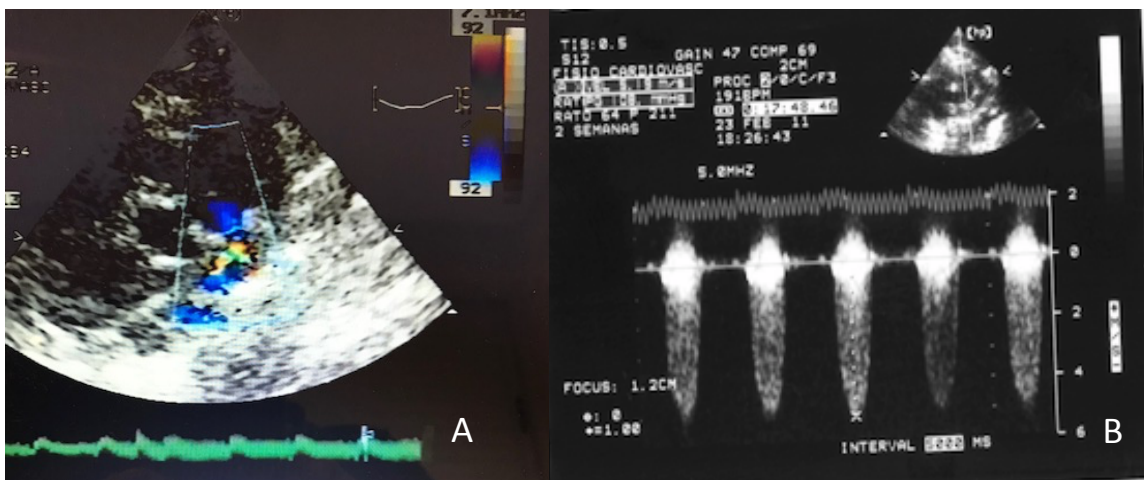


Figura 8: Em A corte paraesternal transversal ao nível da via de saída do VD e do tronco da artéria pulmonar; observe a imagem de mapeamento em cores do fluxo através da bandagem. Em B curva de velocidade do fluxo através da bandagem pulmonar com Doppler contínuo utilizada para cálculo do gradiente sistólico.

3.5- Medidas das cavidades direitas basais em ratos ao ecocardiograma inicial e Variabilidade intra e interobservadores

Por este ser o primeiro estudo que incluiu as medidas das câmaras direitas pelo ecocardiograma no laboratório de Fisiologia Cardíaca Experimental da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo foram analisadas a variabilidade intra e interobservadores e o efeito da curva de aprendizagem.

Para verificar o efeito da curva de aprendizagem foram comparadas as medidas das cavidades direitas do ecocardiograma antes da BAP ou cirurgia controle dos primeiros 54 animais com as dos últimos 54 animais feitas pelo mesmo examinador.

Para a avaliação intraobservador foram analisadas as primeiras medidas das cavidades direitas dos exames de 24 animais após a BAP ou controle, escolhidos aleatoriamente, com uma segunda leitura nos mesmos 24 animais realizadas em imagens gravadas em vídeo em momento posterior pelo mesmo examinador. A análise interobservador foi realizada pela comparação das medidas iniciais das cavidades direitas de 20 animais, escolhidos aleatoriamente, feitas por um observador com as de outro examinador feitas posteriormente também nas mesmas imagens gravadas em

vídeo. Nas três análises as medidas comparadas foram: AsAD (cm²), DdVD (cm), EPVD (cm), VPAVD (%), ESAT (cm); relação E/A fluxo tricúspide; onda S' (cm/s) e relação E/e'.

3.6 Estudo Hemodinâmico

O estudo hemodinâmico foi realizado com os animais aquecidos em tapete térmico (temperatura de 37° C), sob anestesia ajustada com uretana (1,2 g/kg, i.v., e intubação traqueal e ventilação mecânica com frequência de 100 movimentos/minuto e volume corrente de 10mL/Kg enriquecida com oxigênio (0,6 a 0,8 L/min). Um micro manômetro Millar (MikroTip® 2F, Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) teve sua extremidade distal posicionada dentro da cavidade ventricular esquerda a partir de cateterismo da artéria carótida direita para medida da pressão intraventricular. As câmaras direitas foram acessadas com cateter venoso com transdutor de pressão. Os dados obtidos foram analisados pelo software AcqKnowledge® 3.7.5 (Biopac Systems Inc., CA, USA) que mensura os valores instantâneos de pressões ventriculares sistólica (PSVE) e diastólica final (PDfVE), ambas expressas em mmHg, frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) e a primeira derivada temporal de pressão positiva (dP/dT, em mmHg/s) e negativa (-dP/dT, em mmHg/s) (Figura 9).

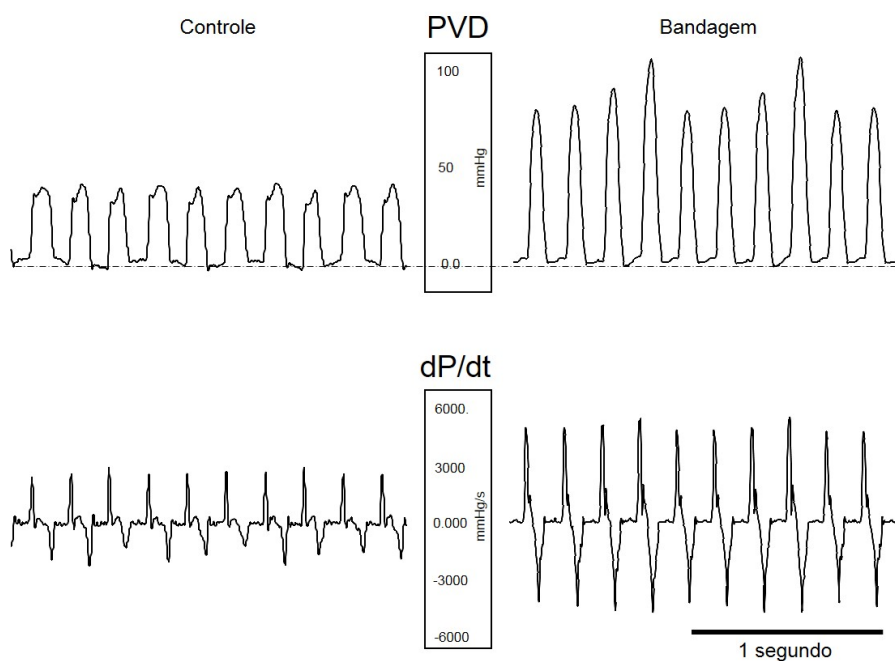


Figura 9. Curva de pressão do VD e gráfico instantâneo da dP/dT em animal bandado e outro controle do estudo.

3.7- Análises macroscópica e histológica

O material para esta análise foi obtido aleatoriamente dos corações de parte da amostra de animais ao final de cada período de observação conforme a randomização de 72hs ou 2, 4, 6, e 8 semanas. Após o término do estudo hemodinâmico foi feita suplementação da anestesia com uretana intraperitoneal 4,8 g/kg para induzir o estado de coma e manter os animais em ventilação assistida, realização da toracotomia transversal e implantação de perfusão retrógrada por cateterismo da aorta. Após isto, as veias cavas superior e inferior foram clampeadas e os átrios drenados com pequena incisão para que o sangue destas cavidades não atingisse os ventrículos; uma solução tampão fosfato foi infundida (por 1 minuto) para que o resíduo de sangue fosse retirado. Em seguida foi infundida uma solução de formol tamponado a 10% por 10 minutos até atingir a circulação coronariana e promover uma melhor fixação do tecido. Após este preparo os corações foram removidos e cortados transversalmente na região média dos ventrículos, fotografados e armazenados em frascos individuais previamente identificados contendo formol a 10% por 72hs. Estes frascos eram encaminhados para o

laboratório de anatomia patológica onde foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Após isto foram realizados cortes de 4 µm do tecido nos blocos em parafina, por micrótomo do tipo “Minot” (Leica RM 2035) e coletados em lâminas de vidro mantidas à temperatura de 37°C para secagem, colagem e posterior coloração pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e também pelo método de picrosirius. A análise histológica quantitativa incluiu medidas do volume nuclear dos miócitos e o teor miocárdico de colágeno e foi realizada pela equipe do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.7.1- Determinação dos pesos do coração e das câmaras cardíacas

Após anestesia com alta dose de uretana (ver acima) os corações dos animais destinados aos estudos de biologia molecular foram removidos, sem os vasos da base. Inicialmente foi obtido o peso total dos corações e após separação foram pesadas as quatro câmaras cardíacas isoladamente; o septo ventricular foi incluído com o VE .

3.7.2- Teor de água do pulmão e do fígado

Foi utilizado como parâmetros de congestão tecidual pulmonar e sistêmica, respectivamente (23,57). Após sacrifício dos animais, o pulmão direito foi isolado por ponto com fio de algodão em torno do hilo pulmonar a fim de se evitar perdas de fluidos durante a manipulação. Procedimento semelhante foi feito com parte do lóbulo central do fígado. Ambos foram retirados dos animais e pesados imediatamente para obter-se o peso úmido (PU). Posteriormente, estas amostras de tecido foram mantidas em estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE; Fanem®; São Paulo, Brasil) por 12 horas, seguida de nova pesagem para obtenção do peso seco (PS) (23,57). O teor de água do pulmão e do fígado (%H₂O) foi calculado conforme a fórmula $\% H_2O = [(PU - PS) / PU] \times 100$; % H₂O é o teor de água.

3.7.3- Volume do núcleo dos cardiomiócitos

As lâminas foram analisadas em microscópio “Olympus BX40” acoplado à câmara digital de vídeo “Sony CMA-D2” com digitalização de imagens por meio do programa Q-Capture Pro 6.0. A análise quantitativa foi realizada com o software Image Tool 3.0 (UTHSCSA). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina. As fibras musculares cardíacas foram visualizadas com aumento de 40 vezes e as mensurações foram realizadas exclusivamente nos núcleos situados no centro da fibra e com forma elipsoide localizados no mesocárdio (Figura 10). Os núcleos cortados em sentido transversal ou oblíquo não foram analisados. Para cada animal estudado foram medidos 50 núcleos num total de seis campos de 75.000 μm^2 cada. O volume (V) de cada núcleo foi calculado com a equação: $V = (D \times d^2 \times \pi) / 6$, sendo: d o menor diâmetro e D o maior diâmetro do núcleo (descrita por Gerdes et al)

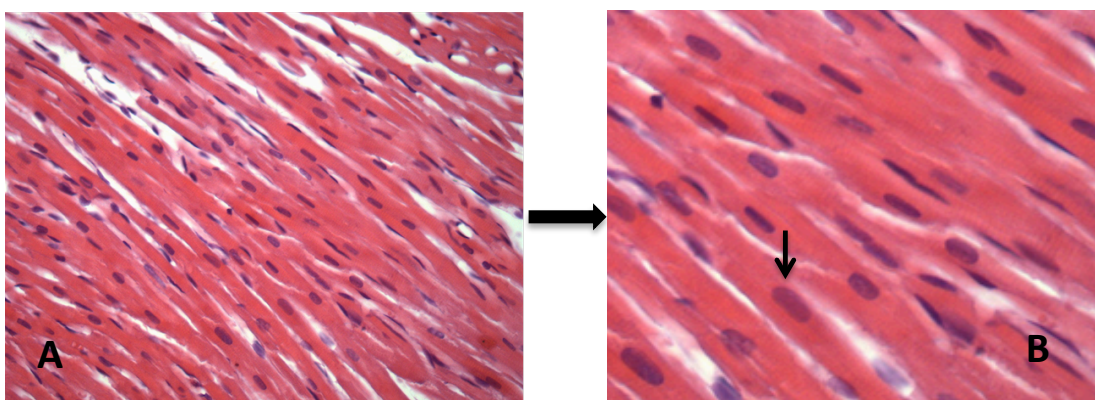


Figura 10. Corte histológico do miocárdio do VD de um dos animais do grupo controle de 2 semanas (lamina t12 4 VD 2A). Em A visão geral e em B ampliada para demonstrar a forma do núcleo para realização das medidas.

3.7.4- Quantificação do colágeno

A quantificação do colágeno foi analisada nos cortes histológicos corados com picrosírius em amostras do mesmo material usado para medidas do volume nuclear com luz polarizada (Junqueira *et al.*, 1979). As imagens foram transferidas para o computador e o software analisava as regiões coradas em amarelo vibrante nas imagens ampliadas em 200 vezes (Figura 11). Foram avaliados de cinco a sete campos de cada animal capturados das paredes livres dos ventrículos esquerdo e direito desprezando os campos do septo interventricular e regiões perivasculares (Junqueira *et al.*, 1979). Os resultados foram expressos em percentagens da área ocupada por fibras colágenas em relação ao respectivo campo de aproximadamente 300.000 μm^2 de área (56).

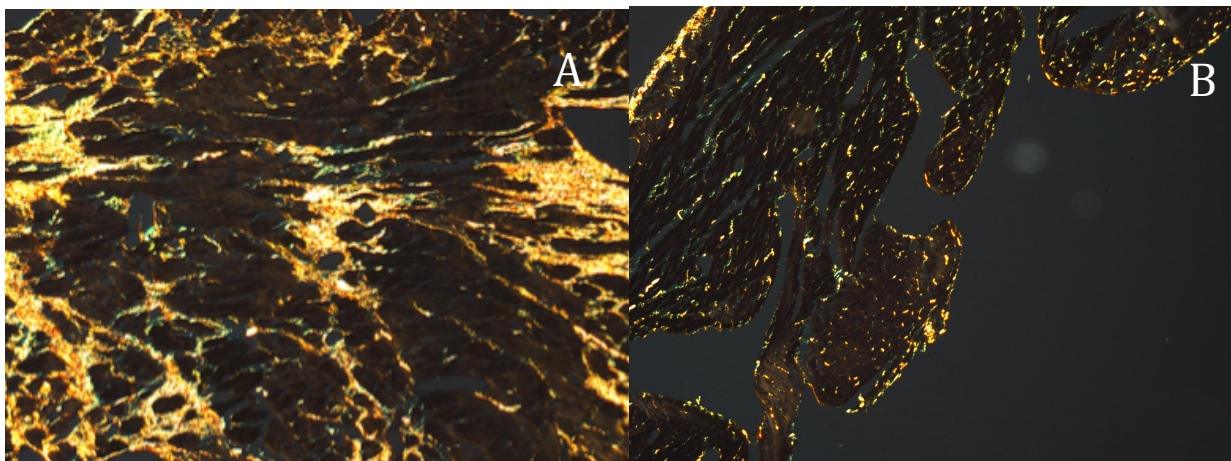


Figura 11. Corte histológico com coloração pelo picrosirius em exposição de luz polarizada, de um dos animais do subgrupo de 8 semanas após BAP(A) e (B) 8 semanas controle

3.8- Biologia molecular

Amostras de tecido miocárdico dos ventrículos direito e esquerdo dos corações dos animais que não utilizados para análise anatômica e histológica foram congeladas a -80°C para a análise da expressão gênica.

3.8.1- Coleta de material biológico para análise da expressão gênica

Imediatamente após a retirada do coração e concomitante à realização das pesagens, o VD foi separado do VE, que ficou com o septo. Depois disto, a parede livre dos ventrículos foi dividida ao meio por corte transversal; estas amostras de tecido miocárdico foram colocadas em 4 tubos de 1,5 ml, dois para o VD e dois para o VE, que foram mantidas em gelo seco para o transporte até os locais de armazenamento. O armazenamento foi mantido em temperatura de -80°C em dois freezers distintos (um tubo de cada ventrículo em cada freezer) até a data do processamento para a realização da análise da expressão gênica.

3.8.2- Expressão gênica

Foi utilizada a técnica de RT-PCR quantitativo. Como esta técnica não permite a análise ampla da expressão gênica como a técnica de microarranjos foi feita a escolha dos genes a serem estudados. A escolha foi feita conforme as publicações que investigaram o remodelamento do VD decorrente de sobrecarga pressórica. Assim, foram selecionados 46 genes (quadro 1) (12, 14, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67). Estes genes são conhecidos como moduladores da hipertrofia dos cardiomiócitos, do crescimento do tecido conectivo, da composição dos miofilamentos contráteis, da sobrevivência celular, angiogênese, estresse oxidativo, cinética do cálcio e metabolismo energético (Tabela 1). Estas análises foram realizadas nos animais controles e nos com BAP; nos animais dos subgrupos de 72 horas foi análise apenas do VD e nos demais subgrupos dos dois ventrículos.

Tabela 1 – Genes analisados por RT-PCR em cadeia conforme a função associada em estudos prévios (+tabela extra 1 nos anexos)

Função	Genes			
Controles	GAPDH	18S		
Matriz extracelular	Col3a1 TNC	Mnp9 Col1a1	Tgf Map3K2	
Hipertrofia	IGF1 Chp2 PrKcb Agr1a	Cabin1 Ace2 Nppb PrKcg	ACE Nppa Nfatc3 PrKca	Edn1
Angiogênese	Vegfa			
Estresse oxidativo	GPX4 Sod1	Hspa1a	CAT	
Apoptose	Bax Faz	MapK14 Tp53	Mapk1 AKt1	
Cinética do cálcio	Pin Casq2	Slac8a1 Ryr2	Atp2a2	
Metabolismo celular	Hk1 Taz	Ndufa3 Pfkf	Ucp2 Slc2a1	
Proteína miofibrilar (fetal)	Myh6	Myh7		
Inflamação	Tnf	Tnfrsf1a	IL6	

Referências: 12, 14, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 59, 60, 61,62, 63, 64, 65, 66, 67

3.8.3- Extração do RNA

As amostras do miocárdio de ambos os ventrículos com peso entre 0,2 e 0,5 g foram homogeneizadas em Trizol[®] Reagent para extração do RNA total conforme instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com 10 U de desoxirribonuclease (RNase)-free por 1 hora a 37°C. Após isto foi realizada extração com volume igual de mistura contendo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 seguida por precipitação com 0,2 M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar os resíduos de fenol e de sal e solubilizado em água. A concentração de RNA total das amostras foi

determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260nm. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. O gel era imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 V por 45 minutos .

3.8.4- Transcrição Reversa (TR)

Para a síntese de cDNA (DNA complementar) foram utilizados 5 µg de RNA total. As amostras eram incubadas com 0,5 µg/ml de oligo dT a 65°C por 5 minutos para se obter a primeira fita de cDNA¹²⁻¹⁸. A TR foi conduzida com volume total de 20 µL contendo 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, 3U de RNAsin e 2,5U de transcriptase reversa (AMV-RT). Após incubação por 1 hora a 37°C, a temperatura era elevada para 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados e inativação da enzima utilizada na reação. Em alguns tubos a transcriptase reversa não foi adicionada a fim de se controlar a contaminação ou amplificação de DNA genômico. O cDNA obtido foi estocado a -20°C para futura realização da reação de PCR.

3.8.5- Reação de Polimerização em Cadeia

O cDNA em estoque obtido na etapa anterior foi utilizado como molde nas reações de PCR. Para evitar a contaminação por DNA genômico foram utilizados primers que detectam especificamente moléculas de DNA genômico não transcritas, seguindo as recomendações do fabricante. Após a PCR, 10 µL de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para detecção de contaminação de DNA genômico. Os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular.

3.8.6- PCR “array” quantitativa

Para esta reação foi utilizado o conjunto “RT² Profiler™ PCR Array - Signal Transduction Pathway Finder” (Superarray Bioscience Corporation®, USA) customizado que permite a avaliação simultânea dos 46 genes alvos envolvidos em 15 diferentes vias de transdução de sinal (Tabela 1). A amplificação, a aquisição dos dados e a curva “melting” foram conduzidas por meio de termociclador iCycler iQ™ (Bio-rad Laboratories®). As reações de amplificação para os genes alvos foram realizadas com sonda “SYBR Green” em equipamento da PE Applied Biosystems (Abi Prism 7000). O “software” iCycler iQ versão 3™ (Bio-rad Laboratories®) foi utilizado para o processamento dos dados. Os genes expressos foram normalizados pelo nível de expressão dos genes *housekeeping* GAPDH ou 18Sr RNA e os dados analisados com software Abi Prism 7000 Sequence Detection System versão 1.6.

3.9- Análise estatística

Os dados foram analisados com o programa SPSS (versão 13.0). As variáveis quantitativas foram apresentadas como média \pm desvio padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar se havia distribuição normal dos dados.

A comparação das variáveis entre os grupos com BAP e controle em cada subgrupo foi feita com teste t se a distribuição era normal ou Wilcoxon se não normal. A comparação entre os subgrupos (diferentes tempos de BAP) das variáveis morfológicas, ecocardiográficas e moleculares foi feita com o teste de ANOVA duas vias se a distribuição foi normal complementada com pós-teste de Tukey, ou com o teste de Kruskal-Wallis complementado com pós-teste de Dunn's se não tinha distribuição normal.

Para análise da variabilidade intraobservador e interobservadores, e da influência da curva de aprendizado das medidas das cavidades direitas foram utilizados testes t ou Wilcoxon, de correlação de Spearman (r) e de Bland-Altman para determinar os limites de concordância (LC).

Para todos os testes, o nível de significância estatística adotado foi de 5%.

4- RESULTADOS

4.1- Animais - mortalidade

Um total de 147 ratos Wistar foram submetidos à cirurgia BAP ou procedimento simulado (grupo controle) (Figura 1). Destes, 30 animais (19,9%) morreram. As mortes ocorreram nos seguintes momentos: 4 durante o primeiro ecocardiograma antes da randomização, 7 entre a cirurgia e o 7º pós-operatório dos quais 6 tinham sido submetidos à BAP e 1 no grupo controle, 10 no período de seguimento dos quais 9 eram do grupo de BAP e 1 do grupo controle, 5 relacionados ao segundo ecocardiograma no grupo submetido à BAP e 4 relacionados ao estudo hemodinâmico invasivo também no grupo submetido à BAP. Portanto, 121 animais foram incluídos; devido ao desenho do estudo, o número de animais variou conforme a análise.

4.2- Percentual de água e pesos total e seco do fígado e do pulmão

Nesta análise foram incluídos 110 animais, 61 no grupo BAP e 49 no grupo controle com distribuição variável nos subgrupos (Figura 1). O peso total, o peso seco e o percentual de água do fígado e do pulmão não foram significativamente diferentes entre os animais com BAP e seus respectivos controles em qualquer dos subgrupos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão do peso (g) total e seco, e percentuais de água de parte do fígado e do lobo central do pulmão direito, e comparação entre os animais com e sem BAP e entre os subgrupos de animais com BAP ao longo do tempo

Subgrupos	Fígado(g)	Fígado seco	% água fígado	Pulmão(g)	Pulmão seco	% água Pulmão
BAP 72 hs	1,5(±0,2)	0,41(±0,1)	71,7 (±0,8)	1,1(±0,1)	0,24(±0)	76(±0,8)
Controle 72hs	1,62(±0,2)	0,46(±0,1)	71,2(±0,4)	1,1(±0)	0,25(±0)	76(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 2s	1,1(±0,3)	0,3(±0,1)	68,2 (±10)	1,21(±0,2)	0,26(±0)	78(±0)
controle 2s	1,1(±0,2)	0,31(±0,1)	69,7(±0,9)	1,4(±0,3)	0,3 (±0,1)	77(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 4s	1,2(±0,5)	0,34(±0,1)	71 (±2,3)	1,2 (±0,5)	0,28(±0,1)	7(±0,2)
controle 4s	1,1(±0,1)	0,33(±0,03)	69,8(±0,8)	1,5 (±0,2)	0,30(±0)	78(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 6s	1,29(±0,33)	0,38(±0,1)	70(±1,5)	1,2 (±0,1)	0,27(±0)	77(±0)
controle 6s	1,31(±0,1)	0,42(±0,1)	67,3 (±6,1)	1,4 (±0,2)	0,3 (±0)	77(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 8s	1,3(±0,23)	0,38(±0,1)	70(±2,9)	1,4 (±0,3)	0,3 (±0,1)	77(±0)
controle 8s	1,32(±0,44)	0,39(±0,1)	69,9 (±0,8)	1,3 (±0,1)	0,3(±0)	78(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns

BAP: bandagem da artéria pulmonar; hs: horas; ns: diferença não significante; p: significância estatística pelo teste t entre animais com BAP e controles em cada subgrupo; s: semanas.

4.3- Peso das cavidades cardíacas

Nesta análise foram incluídos 52 animais, 27 no grupo BAP e 25 no grupo controle com distribuição variável nos subgrupos (Figura 1). Nos animais com BAP o peso do AD foi significativamente maior em relação aos respectivos controles, exceto nos animais com 8 semanas de observação (Tabela 3, Figura 13); entre os subgrupos com BAP não houve diferença significante (Tabela 3). O peso do VD nos animais com BAP foi significativamente maior em todos os subgrupos em relação aos controles (Tabela 3; Figura 13); entre os subgrupos com BAP o peso do VD foi significativamente maior com 8 semanas em relação a 2 semanas (Tabela 3).

O peso do AE dos animais com BAP foi significativamente maior que os controles apenas no subgrupo de 4 semanas (Tabela 3; Figura 12); entre os subgrupos com BAP não houve diferença significante (Tabela 3). O peso do VE dos animais com BAP foi significativamente maior que os controles nos subgrupos com 4 e 8 semanas; nos animais com BAP esta variável foi significativamente maior com 4 e 8 semanas em relação a 2 e 6 semanas (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio-padrão do peso (g) das cavidades cardíacas e comparação entre os animais com e sem BAP e entre subgrupos de animais BAP ao longo do tempo .

Subgrupos	VD(g)	VE(g)	AD(g)	AE(g)
BAP 2s	0,34(±0,05)	0,79(±0,08)	0,12(±0,04)	0,03(±0,02)
controle 2s	0,17(±0,02)	0,68(±0,04)	0,03(±0,01)	0,03(±0,01)
p	<0,05	ns	<0,05	ns
BAP 4s	0,38(±0,09)	0,9(±0,11) ^{b,d}	0,09(±0,04)	0,04(±0,01)
controle 4s	0,17(±0,04)	0,74(±0,02)	0,02(±0)	0,02(±0)
p	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05
BAP 6s	0,42(±0,1)	0,79(±0,05)	0,14(±0,09)	0,03(±0)
controle 6s	0,2(±0,04)	0,74(±0,05)	0,03(±0)	0,03(±0)
p	<0,001	ns	<0,001	ns
BAP 8s	0,48(±0,12) ^b	0,96(±0,11) ^{b,d}	0,09(±0,02)	0,04(±0)
controle 8s	0,17(±0,05)	0,71(±0,05)	0,02(±0)	0,03(±0)
p	<0,001	<0,001	<0,05	ns

AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; BAP: bandagem da artéria pulmonar; hs: horas; ns: diferença não significativa; p: resultado da comparação entre animais com e sem BAP em cada subgrupo; s: semanas; VD: VD; VE: VE; Indicação de diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de animais com BAP - ^a: maior em relação a 72 horas; ^b: maior em relação a 2 semanas; ^c: maior em relação a 4 semanas; ^d: maior em relação a 6 semanas; ^e: maior em relação a 8 semanas.

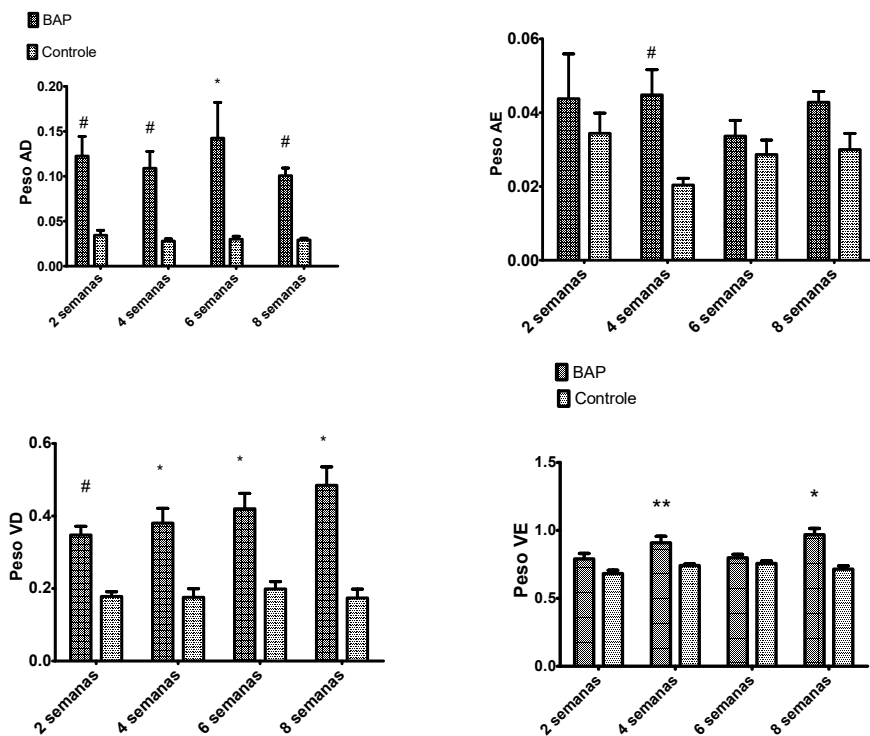


Figura 12: Distribuição do peso (g) das câmaras cardíacas nos animais com BAP e controles nos diferentes tempos de análise; *p<0,001; ** p<0,01; # p<0,05. AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; VD: VD; VE: VE.

4.4- Volume dos núcleos e quantificação de fibrose

Nesta análise foram incluídos 59 animais, 35 no grupo BAP e 24 no grupo controle com distribuição variável nos subgrupos. O volume do núcleo dos miócitos dos ventrículos direito e esquerdo foi significativamente maior nos animais com BAP em relação aos controles em todos os subgrupos (Tabela 4, Figura 13) No VD o volume nuclear foi significativamente maior no subgrupo de 72 horas em relação aos subgrupos de 4, 6 e 8 semanas e no de 2 semanas em relação ao de 4, 6 e 8 semanas (Tabela 4). O volume do núcleo do VE foi significativamente maior no subgrupo de 72 horas em relação aos demais e no subgrupo de 2 semanas em relação ao de 4 semanas (Tabela 4).

No VD a porcentagem de fibrose foi significativamente maior nos animais com BAP em relação aos controles com 4, 6 e 8 semanas (Tabela 4, Figura 13). Nos subgrupos com BAP a porcentagem de fibrose do VD foi significativamente maior com 4, 6 e 8 semanas em relação a 72 horas e com 8 semanas em relação a 2 semanas. A porcentagem de fibrose no VE foi significativamente maior nos animais com BAP em relação aos controles com 2 e 8 semanas (Tabela 4). Nos subgrupos com BAP a porcentagem de fibrose no VE foi significativamente maior com 2, 6 e 8 semanas em relação a 72 horas e com 8 semanas em relação a 2, 4 e 6 semanas. Não houve diferença significativa no volume nuclear e na porcentagem de fibrose de ambos os ventrículos entre os diferentes subgrupos.

Tabela 4. Média e desvio-padrão do volume do núcleo dos cardiomiócitos e da porcentagem de fibrose dos animais com BAP e controles; comparações entre animais com BAP e entre os subgrupos

Subgrupos	VNC VE(μm^3)	% Fibrose VE	VNC VD (μm^3)	% Fibrose VD
BAP 72 hs	136,4($\pm 47,7$) ^{b,c,d,e}	0,7($\pm 0,1$)	183,6(± 52) ^{c,d,e}	0,6 ($\pm 0,1$)
controle 72hs	46,9($\pm 8,6$)	0,4($\pm 0,2$)	57,2($\pm 9,1$)	0,4 ($\pm 0,3$)
p	<0,001	ns	<0,001	Ns
BAP 2s	103,8($\pm 25,1$) ^c	1,2 ($\pm 0,2$) ^a	172,6($\pm 34,8$) ^c	3,5($\pm 1,6$)
controle 2s	41,6($\pm 5,5$)	0,4($\pm 0,1$)	34,2($\pm 3,2$)	0,8($\pm 0,3$)
p	<0,001	<0,01	<0,001	Ns
BAP 4s	74,1($\pm 15,2$)	0,9 ($\pm 0,4$)	97 (± 17)	5,9($\pm 1,29$) ^a
controle 4s	42,2 ($\pm 6,9$)	0,6 ($\pm 0,1$)	37,8($\pm 7,3$)	0,96($\pm 0,25$)
p	<0,05	ns	<0,01	<0,05
BAP 6s	86,4($\pm 19,2$)	1,2 ($\pm 0,4$) ^a	123,8 (± 29)	7,8($\pm 2,68$) ^a
controle 6s	40,8($\pm 6,4$)	0,8 ($\pm 0,2$)	36,2 ($\pm 3,5$)	1,18($\pm 0,8$)
p	<0,01	ns	<0,001	<0,01
BAP 8s	82,5(± 15)	2,2 ($\pm 0,4$) ^{b,c,d}	110(± 31)	10,4($\pm 5,1$) ^{a,b}
controle 8s	44,8($\pm 4,9$)	0,7 ($\pm 0,3$)	40 ($\pm 6,3$)	1 ($\pm 0,3$)
p	<0,05	<0,001	<0,01	<0,001

%; porcentagem; BAP: bandagem da artéria pulmonar; hs: horas; VD: VD; VE: VE; VNC: volume do núcleo dos miócitos; μm : micra; p: significância estatística entre animais com BAP e controles. Indicação de diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de animais com BAP - ^a: maior em relação a 72 horas; ^b: maior em relação a 2 semanas; ^c: maior em relação a 4 semanas; ^d: maior em relação a 6 semanas; ^e: maior em relação a 8 semanas.

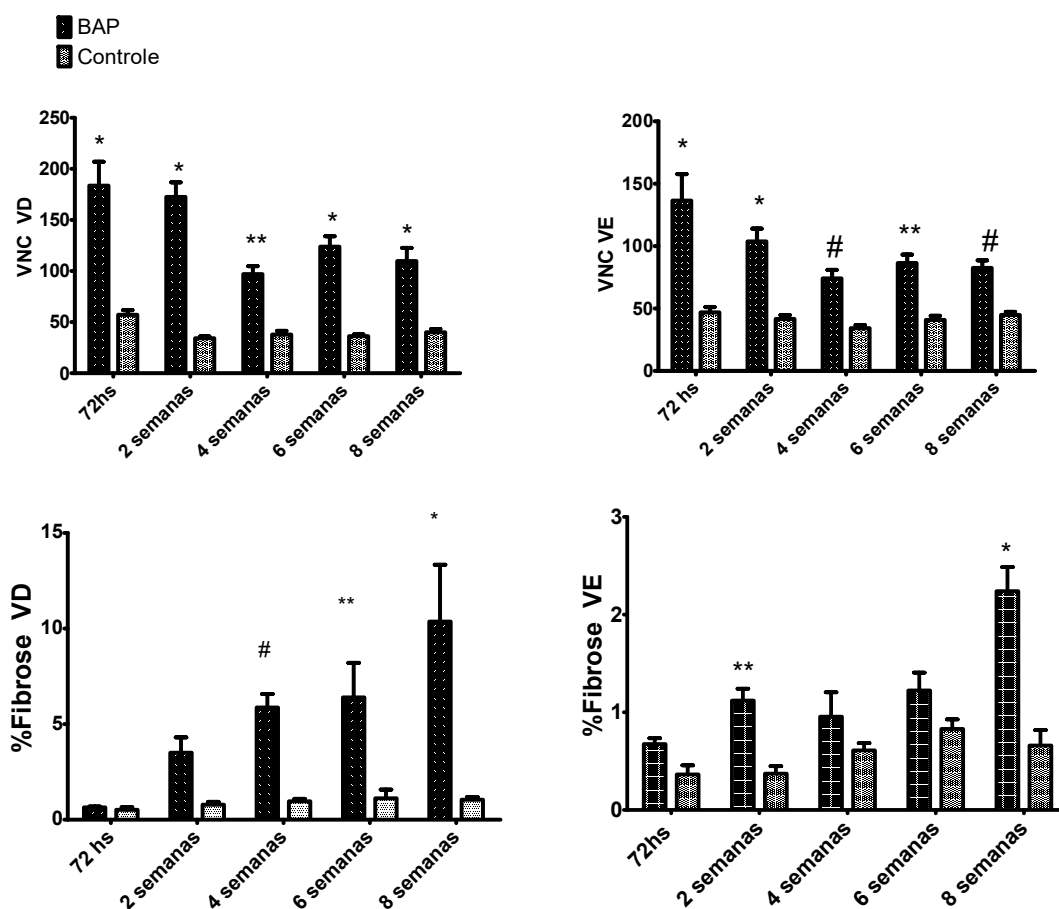


Figura 13. Comportamento do volume do núcleo dos cardiomiócitos (em cima) e da porcentagem (%) de fibrose (em baixo) dos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) nos animais com BAP e controles. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$.

4.5- Medidas das cavidades direitas basais em ratos ao ecocardiograma inicial e análise da variabilidade intra e interobservador

Para todas as variáveis ecocardiográficas relacionadas às cavidades direitas não houve diferença significativa entre as medidas realizadas nos primeiros e nos últimos 54 animais avaliados (Tabela 5). Da mesma forma, não houve diferença significativa entre as duas medidas realizadas pelo mesmo observador (variabilidade intraobservador) (Tabela 6) e entre as medidas dos dois observadores (variabilidade interobservadores) (Tabela 7); a correlação das medidas entre os dois observadores apresentou concordância significativa (r variou de 0,68 a 0,99).

Tabela 5 - Média, mediana, desvio padrão, valores mínimo e máximo das medidas realizadas nos primeiros 54 animais comparadas com as realizadas nos últimos 54 animais a entrarem no estudo.

Variável	Grupo	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor P Teste t	Valor P Mann Whitney
Dd V	54 p	0,293	0,294	0,044	0,108	0,434	0,0598	
	54 u	0,305	0,305	0,037	0,214	0,375		
ESAT	54 p	0,311	0,322	0,049	0,234	0,441		0,9748
	54 u	0,311	0,322	0,039	0,236	0,380		
Ad V	54 p	2,065	2,070	0,333	1,260	2,830		0,9624
	54 u	2,068	2,065	0,335	1,110	2,780		
As V	54 p	0,086	0,085	0,019	0,049	0,153	0,5620	
	54 u	0,089	0,087	0,022	0,052	0,139		
VPAV	54 p	0,958	0,959	0,008	0,939	0,972	0,6901	
	54 u	0,956	0,957	0,011	0,922	0,979		
E	54 p	0,323	0,295	0,098	0,167	0,646	0,9478	
	54 u	0,323	0,306	0,097	0,212	0,751		
A	54 p	0,451	0,439	0,079	0,327	0,700	0,2402	
	54 u	0,457	0,462	0,085	0,230	0,728		
E/A	54 p	0,702	0,663	0,215	0,304	1,669	0,6395	
	54 u	0,733	0,621	0,292	0,473	1,862		
E'	54 p	0,047	0,046	0,007	0,034	0,059	0,3353	
	54 u	0,046	0,045	0,009	0,029	0,079		
S'	54 p	0,043	0,042	0,007	0,023	0,061		0,9052
	54 u	0,042	0,041	0,009	0,024	0,064		
E/É	54 p	6,455	6,537	1,301	3,353	9,912		0,2166
	54 u	6,790	6,813	1,233	4,911	9,943		

p primeiros: u últimos

Tabela 6 – Comparação das diferenças entre as medidas das variáveis das cavidades direitas realizadas pelo mesmo observador em dois momentos distintos.

Variável	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor
Dd VD	24	0,018	0,017	0,025	-0,047	0,060	0,0019
ESAT	24	0,403	0,019	0,891	-0,068	2,728	0,0069
Ad VD	24	0,006	0,008	0,036	-0,078	0,076	0,2530
As VD	24	-0,002	-0,004	0,019	-0,033	0,034	0,5484
VPAVD	24	0,017	0,025	0,101	-0,187	0,258	0,5088
E	24	0,011	0,005	0,039	-0,070	0,092	0,1530
A	24	0,016	0,020	0,044	-0,050	0,132	0,1490
E/A	24	0,022	-0,014	0,140	-0,160	0,555	0,9888
E	24	0,003	0,002	0,005	-0,005	0,015	0,0271
S	24	0,001	0,001	0,004	-0,004	0,009	0,3445
E/E	24	-0,096	-0,299	1,419	-2,837	2,489	0,6231
Grad. VD/TP	24	0,141	0,166	0,282	-0,545	0,902	0,0096

Tabela 7 – Média, desvio padrão, comparações (p), correlações (r) e limites de concordância (LC) das medidas de variáveis realizadas pelos examinadores 1 e 2

Variável	Examinador 1 (média ±DP)	Examinador 2 (média ±DP)	Teste T ou Mann- Whitney (p)	Correlação (r ²)	Concordância(LC) (p)
AsAd	0,112±0,028	0,116±0,026	0,83	0,96	<0,0001
EPVD	0,050±0,008	0,052±0,008	0,33	0,68	=0,003
Dd VD	0,322±0,051	0,325±0,047	0,85	0,91	<0,0001
VPAVD	0,51±0,09	0,510±0,07	0,96	0,92	<0,0001
E/A	0,73±0,17	0,73±0,19	0,95	0,97	<0,0001
S	0,04±0,01	0,04±0,01	0,44	0,99	<0,0001
E/E	7,60±2,97	5,96±1,97	0,57	0,98	<0,0001

Medidas ecocardiográficas das cavidades cardíacas direitas em ratos tiveram boa concordância entre os examinadores e pelo mesmo examinador e podem ser utilizadas com segurança em pesquisa. Não foi notada influência da curva de aprendizado nas medidas.

4.6- Ecocardiograma

Esta análise incluiu ecocardiogramas de 121 ratos dos quais 69 do grupo BAP e 52 controles distribuídos nos subgrupos de 72 horas a 8 semanas (Figura 1). No momento do ecocardiograma a média da frequência cardíaca nos animais do grupo BAP (239 bpm) não foi significativamente diferente dos controles (217 bpm) ($p=0,74$).

4.6.1- Parâmetros ecocardiográficos das cavidades direitas

A AsAD do grupo BAP foi significativamente maior que a dos controles nos subgrupos com 2, 4, 6 e 8 semanas. A EPVD foi significativamente maior em relação aos controles em todos os subgrupos enquanto o DdVD apenas no subgrupo de 8 semanas (Tabela 8; Figura 14). Entre os parâmetros de função sistólica do VD a ESAT foi significativamente menor nos animais com BAP em comparação aos controles no subgrupo de 72 horas, a VPAVD nos subgrupos 6 e 8 semanas e a onda S nos subgrupos 4, 6 e 8 semanas (Tabela 8; Figura 14).

Nos animais do grupo BAP a AsAD e o DdVD foram significativamente maiores nas semanas 2, 4, 6 e 8 em relação à avaliação com 72 horas e na semana 8 em relação à semana 2 (Tabela 8). A EPVD foi significativamente maior nas semanas 4, 6 e 8 em relação à avaliação com 72 horas. As variáveis ecocardiográficas de função sistólica do VD (ESAT, VPAVD e onda S) dos animais com BAP não tiveram diferenças significantes entre os diversos subgrupos BAP (Tabela 8).

Tabela 8. Média, desvio-padrão e análise comparativa das variáveis anatómicas das cavidades direitas, da função sistólica do VD e do gradiente de pressão através do tronco pulmonar nos animais dos grupos com BAP e controles nos diversos subgrupos

Subgrupos	AsAD (cm ²)	EPVD (cm)	DdVD (cm)	ESAT (cm)	S' (cm/s)	VPAVD (%)	Grad TP mmHg
BAP 72 hs	0,11(±0,01)	0,09(±0,01)	0,27(±0,03)	0,25(±0,02)	0,04(±0,01)	57(±0,12)	37(±7)
controle 72hs	0,07(±0)	0,05(±0)	0,31(±0,05)	0,36(±0,02)	0,04(±0,01)	66(±0,04)	3,4(±0,5)
p	ns	<0,01	ns	<0,05	ns	ns	<0,05
BAP 2s	0,21(±0,07) ^a	0,1(±0,01)	0,34(±0,03) ^a	0,26(±0,05)	0,03(±0,01)	55(±0,1)	76(±21)
controle 2s	0,09(±0,01)	0,04(±0)	0,3(±0,02)	0,3(±0,04)	0,045(±0,01)	62(±0,07)	3,7(±1)
p	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,05	<0,01	<0,001
BAP 4s	0,24(±0,09) ^a	0,11(±0,02) ^a	0,35(±0,07) ^a	0,28(±0,05)	0,03(±0,01)	56(±0,12)	88(±28)
controle 4s	0,09(±0)	0,04(±0,01)	0,31(±0,02)	0,31(±0,04)	0,047(±0,01)	60(±0,07)	4(±0,5)
p	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,05	<0,05	<0,001
BAP 6s	0,24(±0,07) ^a	0,11(±0,02) ^a	0,36(±0,07) ^a	0,31(±0,07)	0,03(±0,01)	51(±0,15)	86(±33)
controle 6s	0,09(±0,01)	0,05(±0,01) ^a	0,31(±0,03)	0,32(±0,04)	0,051(±0,01)	67(±0,04)	4(±0,6)
p	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,01	<0,01	<0,001
BAP 8s	0,27(±0,08) ^{a,b}	0,12(±0,02)	0,38(±0,05) ^{a,b}	0,3(±0,05)	0,03(±0,01)	51(±0,09)	89(±27)
controle 8s	0,09(±0,01)	0,05(±0,01)	0,3(±0,02)	0,32(±0,06)	0,047(±0,01)	62(±0,04)	4(±0,5)
p	<0,001	<0,001	<0,001	ns	<0,05	<0,05	<0,001

AsAD: área sistólica do átrio direito; DVD; diâmetro diastólico VD; EPVD: espessura da parede do VD; ESAT: excursão sistólica do anel tricúspide; S': velocidade máxima de excursão do anel tricúspide; p: resultado da comparação entre animais com e sem BAP; TP: tronco pulmonar; VPAVD: Variação percentual da área do VD. Grad: gradiente de pressão ao ecocardiograma. Indicação de diferença estatisticamente significante entre os subgrupos de animais com BAP - ^a: maior em relação a 72 horas; ^b: maior em relação a 2 semanas; ^c: maior em relação a 4 semanas; ^d: maior em relação a 6 semanas; ^e: maior em relação a 8 semanas.

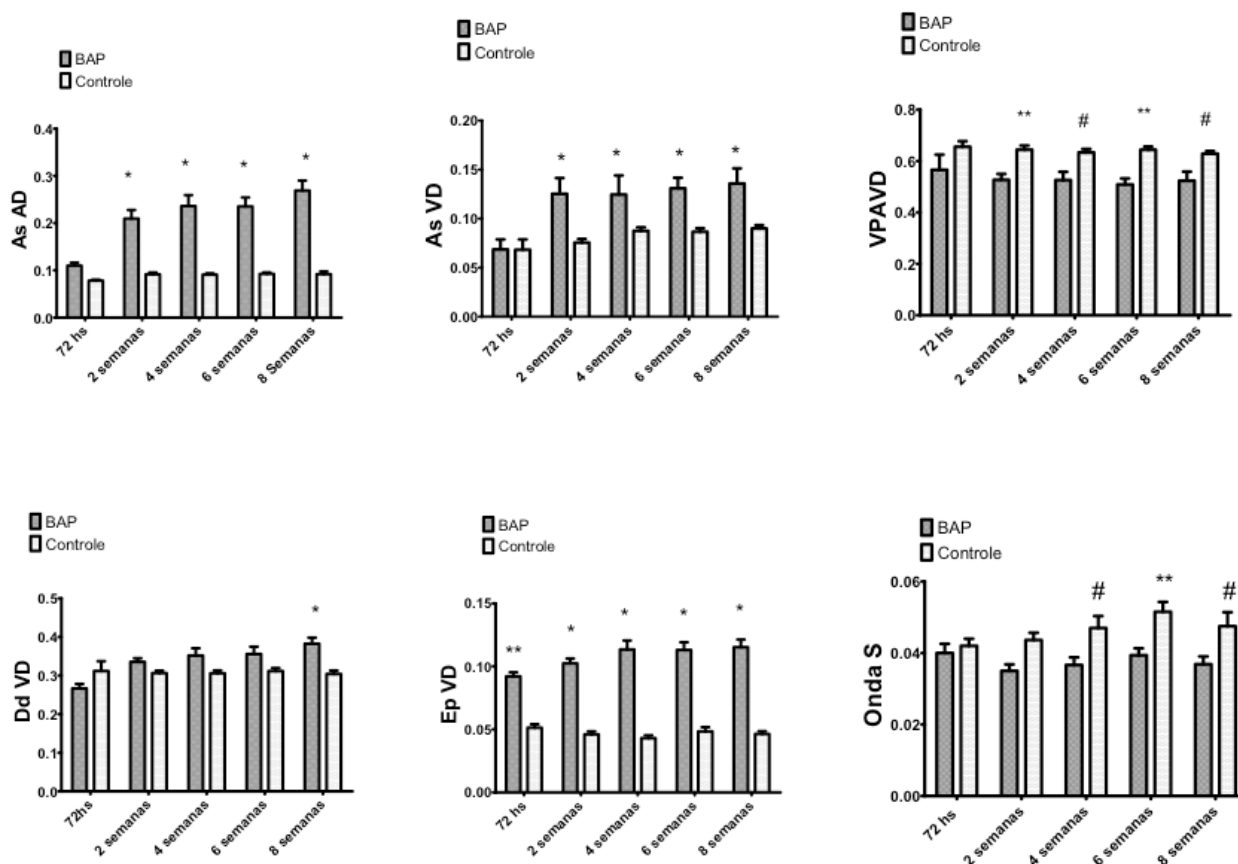


Figura 14: Comportamento dos parâmetros anatômicos das cavidades direitas e da função sistólica do ventrículo direito ao ecocardiograma dos animais com BAP e dos controles; As: área sistólica (cm²); AD: átrio direito; Dd: diâmetro diastólico (cm); Ep: espessura diastólica da parede livre do VD (cm); VD: ventrículo direito; VPAVD: variação percentual da área do VD; Onda S: velocidade de deslocamento sistólico da parede lateral do VD. *p<0,001; ** p<0,01; # p<0,05.

Entre os parâmetros de função diastólica do VD a onda E e a relação E/A do fluxo diastólico tricúspide e onda E' do anel tricúspide ao Doppler tecidual não tiveram diferença significativa entre os animais com BAP e os controles. Em relação aos controles a onda A do fluxo diastólico tricúspide foi significativamente maior que os animais com BAP com 6 e 8 semanas e a relação E/E' foi maior com 72 horas e 6 e 8 semanas (Tabela 9).

Na comparação entre os subgrupos com BAP a onda A foi significativamente maior com 6 e 8 semanas em relação a 2 semanas e a relação E/E' foi maior com 72 horas em relação a 4 semanas e com 6 semanas em relação a 2 semanas. Entre os animais do grupo controle as variáveis de função diastólica não tiveram diferença significativa entre os subgrupos.

Tabela 9. Médias e desvios-padrão das variáveis ecocardiográficas de função diastólica do VD e comparação entre elas nos subgrupos

Subgrupos	E (cm/s)	A (cm/s)	E/A	E/E'	E' (cm/s)
BAP 72 hs	0,3(±0)	0,5 (±0,1)	0,7(±0,1)	11 (±4) ^{c,d}	0,035(±0,01)
controle 72hs	0,3 (±0)	0,4 (±0)	0,7(±0,1)	75(±0)	0,042(±0)
p	ns	ns	ns	<0,05	ns
BAP 2s	0,4(±0,1) ^a	0,43(±0,1)	0,88(±0,4)	8,37(±3,5)	0,043(±0) ^a
controle 2s	0,3(±0)	0,4(±0,1)	0,73(±0,1)	7,11(±1,4)	0,043(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 4s	0,36(±0,1)	0,48(±0,1)	0,84(±0,4)	8,6(±2,5)	0,042(±0)
controle 4s	0,3(±0,1)	0,4(±0,1)	0,74(±0,2)	6,46(±1,7)	0,046(±0)
p	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 6s	0,44(±0,1) ^b	0,53(±0,1) ^b	0,98(±0,6)	10,88(±4)	0,043(±0) ^a
controle 6s	0,36(±0,1)	0,38(±0,1)	0,98(±0,3)	7,42(±2,1)	0,049(±0)
p	ns	<0,01	ns	<0,01	ns
BAP 8s	0,41(±0,1)	0,52(±0,1) ^b	0,79(±0,2)	9,49(±2,7)	0,045(±0) ^a
controle 8s	0,33(±0)	0,38(±0)	0,88(±0,2)	6,42(±1,4)	0,051(±0)
p	ns	<0,01	ns	<0,05	ns

E: velocidade de fluxo do enchimento rápido do VD; A: velocidade de fluxo da contração atrial direita; E/A: relação das ondas E e A do fluxo diastólico tricúspide; E/E': relação entre onda E do fluxo diastólico tricúspide e a onda E' do Doppler tecidual do anel tricúspide. Hs: horas; p: resultado da comparação entre animais com e sem BAP; s: semanas; Indicação de diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de animais com BAP - ^a: maior em relação a 72 horas; ^b: maior em relação a 2 semanas; ^c: maior em relação a 4 semanas; ^d: maior em relação a 6 semanas; ^e: maior em relação a 8 semanas

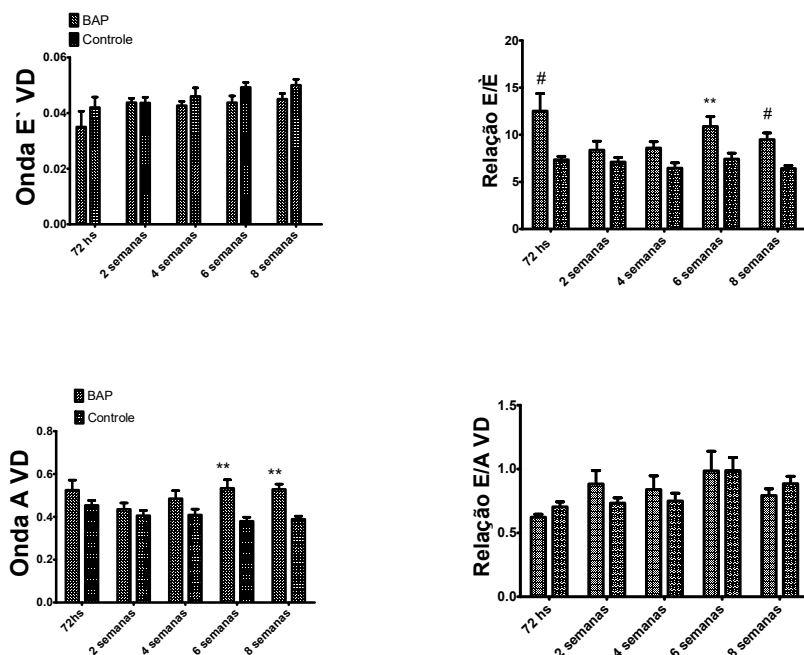


Figura 15 Comportamento dos parâmetros de função diastólica do VD dos animais com BAP e dos controles ao longo do tempo; onda A , onda E relação E/A e relação E/E' ; VD: ventrículo direito. *p<0,001; ** p<0,01; # p<0,05.

A média e o desvio-padrão do gradiente sistólico máximo ao ecocardiograma Doppler com 72 horas, 2, 4, 6 e 8 semanas após a BAP foram, respectivamente, de 37 ± 7 mmHg; 76 ± 22 mmHg; 88 ± 29 mmHg; 86 ± 33 mmHg; 90 ± 28 mmHg. O gradiente sistólico máximo nos animais com 2, 4, 6 e 8 semanas após a BAP foi significativamente maior que o dos animais com 72 horas. Nos animais controle (cirurgia simulada) o fluxo era laminar e a velocidade máxima variou de 0,4 m/s a 0,6 m/s, sem caracterizar estenose.

4.6.2- Parâmetros ecocardiográficos das cavidades esquerdas

O diâmetro anteroposterior do átrio esquerdo, os diâmetros diastólico e sistólico e a espessura diastólica do septo e da parede lateral inferior do VE dos animais com BAP não foram significativamente diferentes das dos animais controles nos diferentes subgrupos analisados (Tabela 10). A variação percentual da área do VE foi significativamente menor nos animais com BAP em relação aos controles apenas no subgrupo 72 horas. Entre os animais com BAP esta variável foi significativamente menor com 72 horas comparada com 2, 4, 6 e 8 semanas ($p < 0,001$).

Tabela 10 – médias e desvios-padrão dos parâmetros anatômicos das cavidades esquerdas e de função sistólica do VE ao ecocardiograma dos animais com e sem BAP e resultados da comparação entre eles e entre os subgrupos

Subgrupos	AE (cm)	Septo (cm)	DdVE (cm)	PVE (cm)	DsVE (cm)	VPAVE (%)
BAP 72 hs	0,4(±0)	0,1 (±0)	0,67(±0,1)	0,11(±0)	0,34(±0)	0,41(±0)
Controle 72hs	0,4 (±0)	0,1 (±0)	0,68(±0,1)	0,11(±0,)	0,35(±0)	0,6(±0,2) ^a
p	ns	ns	ns	ns	ns	<0,001
BAP 2s	0,41(±0)	0,1 (±0)	0,7(±0,1)	0,12(±0)	0,35(±0,1)	0,66(±0,1)
Controle 2s	0,36(±0)	0,1(±0)	0,7(±0,1)	0,1(±0)	0,37(±0)	0,7(±0) ^a
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 4s	0,4 (±0,1) ^a	0,1 (±0)	0,7(±0,1)	0,11(±0)	0,34(±0,1)	0,72(±0,1)
Controles 4s	0,4(±0)	0,1(±0,)	0,75(±0)	0,12(±0)	0,4(±0)	0,72(±0) ^a
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 6s	0,5(±0,1) ^a	0,1 (±0)	0,8(±0,1) ^{a,c}	0,12(±0)	0,38(±01)	0,72(±0)
Controles 6s	0,4 (±0,1)	0,1 (±0)	0,8(±0)	0,12(±0)	0,41(±0)	0,74(±0,) ^a
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 8s	0,4 (±0,1) ^a	0,1 (±0,01)	0,8(±0) ^{a,c}	0,13(±0) ^{a,b,c,d}	0,39(±0,1)	0,69(±0,1)
Controles 8s	0,4 (±0)	0,1 (±0,01)	0,8(±0,1)	0,12(±0)	0,4(±0)	0,68(±0,06) ^a
p	ns	ns	ns	ns	ns	ns

AE: átrio esquerdo; DdVE diâmetro diastólico do VE; PVE: espessura da parede posterior em diástole; DsVE diâmetro sistólico do VE; hs: horas; s: semanas; ns: não significativo; p: resultado da comparação entre animais com e sem BAP. VPAVE: variação percentual da área do VE. Indicação de diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de animais com BAP - ^a: maior em relação a 72 horas; ^b: maior em relação a 2 semanas; ^c: maior em relação a 4 semanas; ^d: maior em relação a 6 semanas; ^e: maior em relação a 8 semanas.

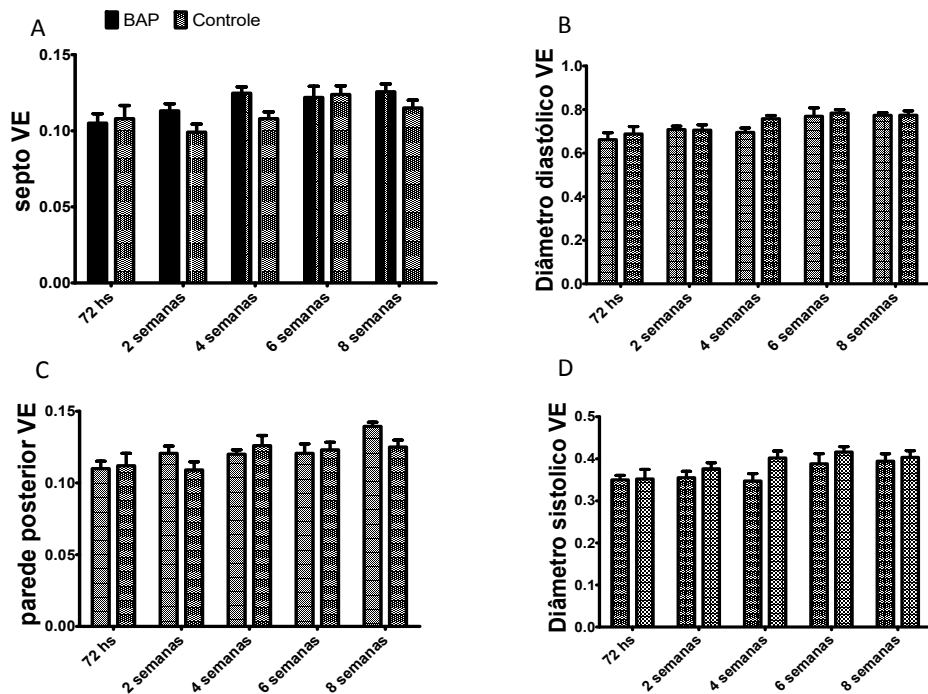


Figura 16- Comportamento dos parâmetros anatômicos do VE em animais com BAP e dos controles ao longo do tempo. VE: ventrículo esquerdo. A: diâmetro diastólico; B: parede posterior; C: diâmetro sistólico.

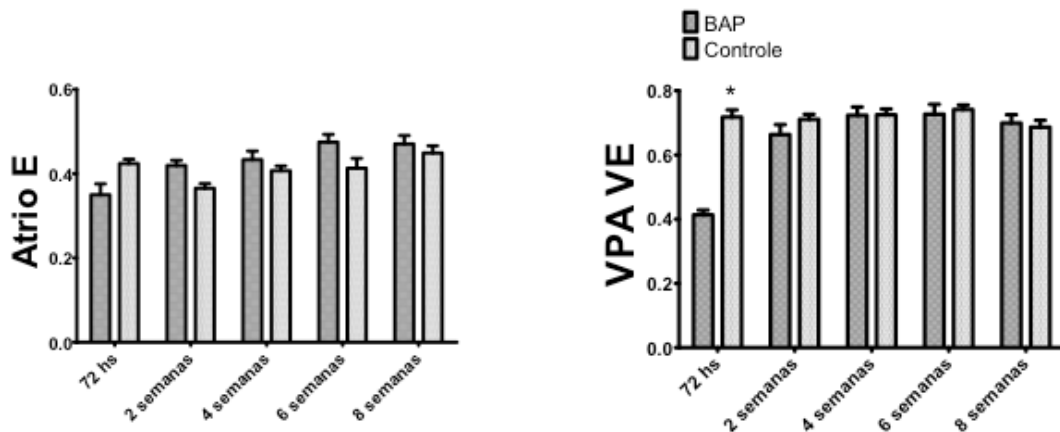


Figura 17- Comportamento do diâmetro do átrio esquerdo e da variação percentual da área do ventrículos esquerdo nos animais com BAP e controles ao longo do tempo. *p<0,001

Entre as variáveis Doppler ecocardiográficas de função diastólica do VE o tempo de desaceleração da onda E e o tempo de relaxamento isovolumétrico foram significativamente maiores nos animais com BAP em todos os subgrupos em relação aos respectivos controles, mas sem diferença significativa entre os subgrupos de animais com BAP (Tabela 11). As outras variáveis de função diastólica do VE ao ecocardiograma não tiveram diferenças significantes entre animais com BAP e controles (Tabela 8; Figura 18).

Tabela 11 - médias e desvios-padrão dos parâmetros de função diastólica do VE ao ecocardiograma Doppler dos animais com e sem BAP e resultados da comparação entre eles e entre os subgrupos.

Subgrupos	Onda E (cm/s)	Onda A (cm/s)	relação E/A	TDE (mseg)	TRIV (mseg)
BAP 72 hs	0,7(±0)	0,5(±0,1)	1,5(±0)	50(±0)	50(±0)
controle 72hs	0,7(±0)	0,4(±0)	1,9(±0,2)	30(±0)	30(±0)
p	ns	Ns	ns	<0,01	<0,01
BAP 2s	0,6(±0,1)	0,3 (±0,1) ^a	2,1(±0,4) ^b	40(±0)	50(±0)
controle 2s	0,6 (±0,1)	0,4(±0,1)	1,8(±0,4)	30(±0)	20(±0)
p	ns	Ns	ns	<0,001	<0,001
BAP 4s	0,6 (±0,1)	0,36(±0,1) ^a	1,7 (±0,3)	40(±0)	50(±0)
controle 4s	0,6 (±0)	0,34(±0)	1,9(±0,3)	30(±0)	20(±0)
p	ns	Ns	ns	<0,001	<0,001
BAP 6s	0,6 (±0,1)	0,4(±0,1)	1,6 (±0,5)	40(±1)	50(±0)
controle 6s	0,7(±0,1)	0,35(±0,1)	1,8 (±0,3)	30(±0)	20(±0)
p	ns	Ns	ns	<0,001	<0,001
BAP 8s	0,6(±0,1)	0,35(±0,1) ^a	1,7 (±0,4)	50(±0)	50(±0)
controle 8s	0,6 (±0,1)	0,35(±0)	1,8 (±0,3)	30(±0)	20(±0)
p	ns	Ns	ns	<0,01	<0,001

A: velocidade de fluxo da contração atrial esquerda; E: velocidade de fluxo do enchimento rápido do VE; E/A: relação das ondas E e A do fluxo diastólico mitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; seg: segundos; hs: horas; s: semanas; p: resultado da comparação entre animais com e sem BAP. Indicação de diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de animais com BAP - ^a: menor em relação a 72 horas; ^b: maior em relação a 72hs semanas

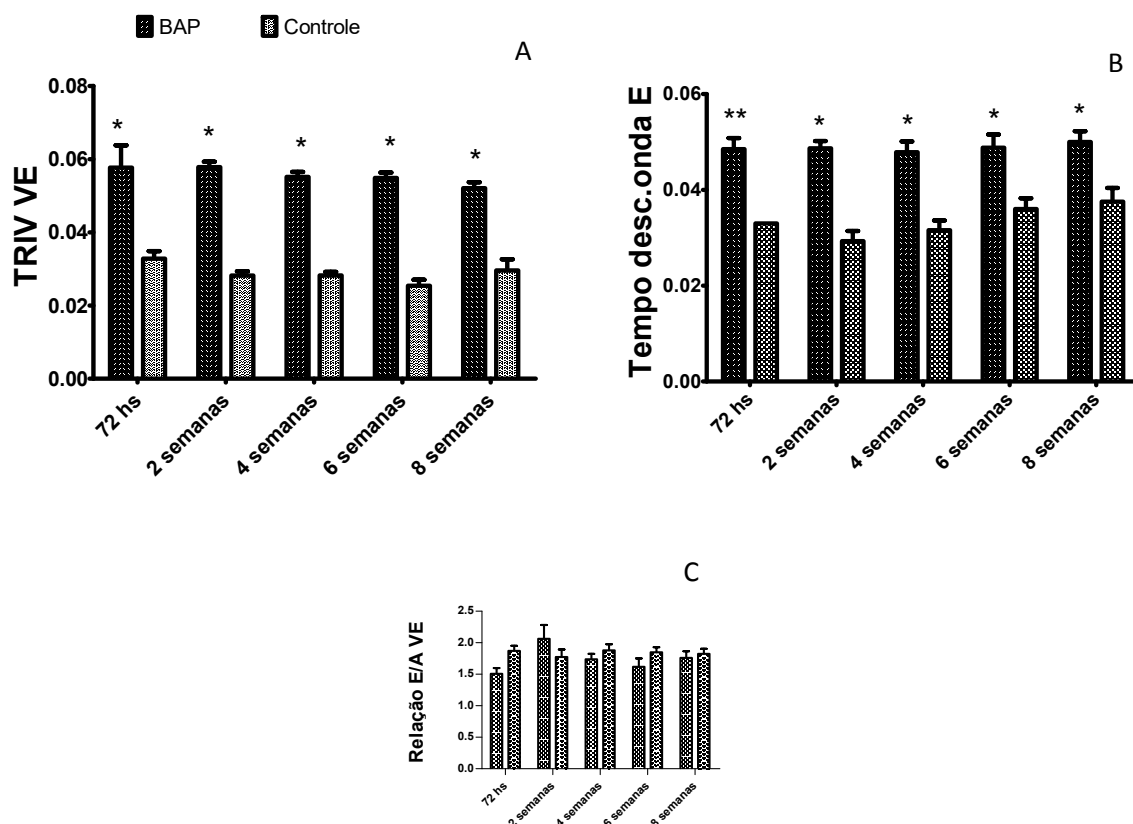


Figura 18 - Comportamento do tempo de relaxamento isovolumétrico (A), do tempo de desaceleração (desc.) da onda E (B), e da relação E/A (C) dos animais com BAP e controles nos diferentes subgrupos. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

4.7- Estudo hemodinâmico invasivo

O estudo hemodinâmico invasivo foi realizado em 96 animais dos quais 43 eram controles e 53 com BAP distribuídos nos diferentes subgrupos (Figura 1). A frequência cardíaca dos animais com BAP não foi significativamente diferente dos respectivos controles em todos os subgrupos (Tabela 12 e Figura 19). No VD a pressão sistólica, a $dP/dT+$ e a $dP/dT-$ foram maiores nos animais com BAP em relação ao respectivos controles em todos os subgrupos. As demais variáveis analisadas não tiveram diferenças significantes. As variáveis hemodinâmicas do VD não tiveram diferença significativa entre os subgrupos tanto nos animais com BAP como nos controles.

Tabela 12 - Parâmetros hemodinâmicos do VD por cateterismo dos animais com BAP, comparação com respectivos controles e análise comparativa das mesmas variáveis entre os subgrupos ao longo do tempo dos animais com BAP

Subgrupos	PsVD	PdVD	PdFVD	dP/dT(+)	dP/dT(-)	FC bpm
BAP 2s	83(±22)	-1,8 (-2,4)	1,0(1)	4386(±1353)	-3411 (±988)	340 (±41)
Controle 2s	33 (±6)	-1,9 (-2)	0,01(-0,2)	2261 (±595)	-1748(±467)	356 (±54)
p	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001	ns
BAP 4s	87 (±20)	-1,9 (-2,7)	0,6 (0,2)	4824,(±1863)	-3579(±1261)	354 (±41)
Controles 4s	33 (±13)	-2,3(-2,2)	0,16(0,5)	2228(±867)	-1604(±563)	352(±37)
p	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001	ns
BAP 6s	92,7 (±22,9)	-2,1(-1,6)	0,65(0,5)	5005(±1576)	-3979(±858)	334 (±51)
Controles 6s	34,3 (±5,7)	-1,2(-1,6)	0,74(0,2)	2650,(±762)	-1784(±471)	352 (±39)
p	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001	ns
BAP 8s	90(±28)	-2,4(-2,5)	0,4(0,4)	4484 (±1690)	-4059(±1134)	335 (±31)
Controles 8s	32 (±6,0)	-1,9(-1,9)	0,13(-0,2)	2602 (±378)	-1825(±400)	358 (±45)
p	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001	ns

dP/dT+: derivada da pressão sistólica em função do tempo; dP/dT- derivada da pressão diastólica em função do tempo; FC: frequência cardíaca; PdVD: pressão diastólica do VD; p: resultado da comparação entre animais com e sem BAP em cada subgrupo. PsVD: pressão sistólica do VD; s: semanas. PdFVD pressão diastólica final do VD. Pressões em mmHg.

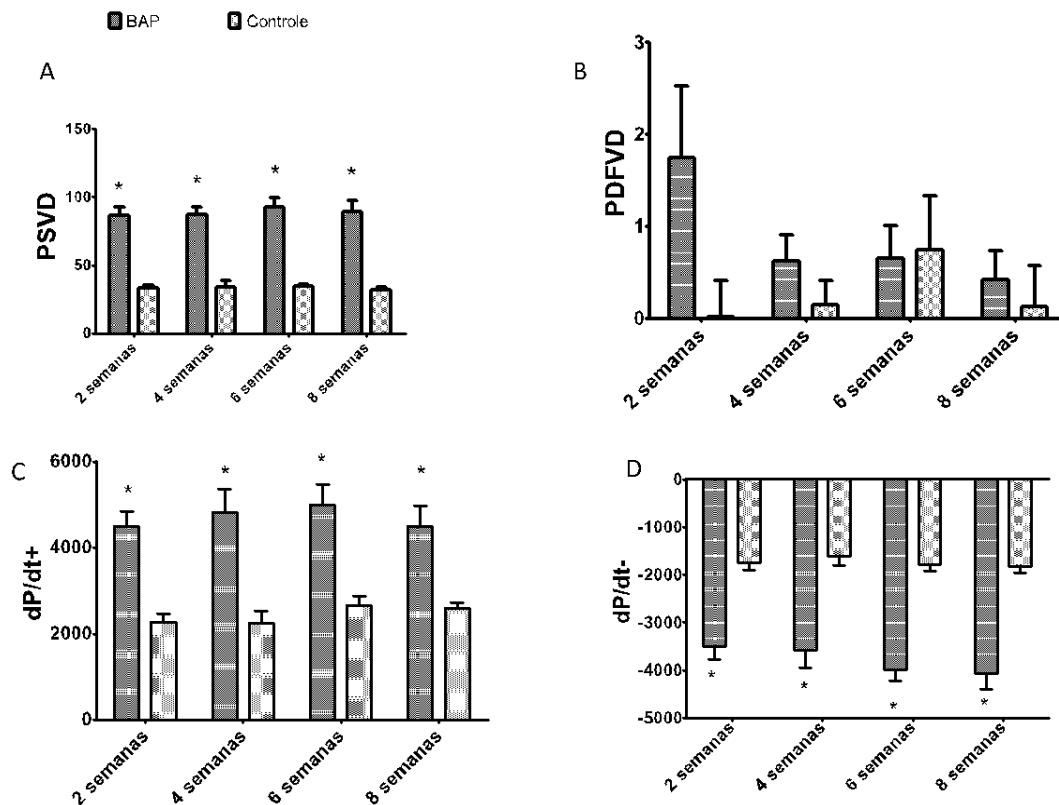


Figura 19- Distribuição da pressão sistólica (PSVD, mmHg) (A), pressão diastólica final do VD (PdFVD, mmHg) (B) e das derivadas das pressões positiva (dP/dt+) (C) e negativa (dP/dt-) (D) do VD nos animais com BAP em comparação com controles ao longo dos diferentes tempos de seguimento. *p<0,001; ** p<0,01; # p<0,05

No VE a pressão diastólica com 6 semanas foi significativamente maior nos animais com BAP em relação aos controles (Tabela 13). Também com 6 semanas a dP/dT (+) foi significativamente menor nos animais com BAP em relação aos controles. Não houve diferença significativa nas demais comparações (Tabela 13). A PdFVE nos animais com BAP foi significativamente maior com 2 semanas em relação a 4, 6 e 8 semanas (Tabela 13).

Tabela 13 - Parâmetros hemodinâmicos do VE por cateterismo dos animais com BAP e comparação com respectivos controles e entre os subgrupos ao longo do tempo dos animais com BAP

Subgrupos	PsVE	PdVE	PdFVE	dP/dT(+)	dP/dT(-)	FC bpm
BAP 2s	114 (±9)	0,69(0,3)	2,3(2,4) ^{b,c,d}	8150,(±1486)	5540(±1257)	340 (±47)
Controle 2s	119 (±15)	-0,6(-0,6)	1,7 (1)	9237(±3419)	6293(±1477)	369,39(±46)
p	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
BAP 4s	112 (±9)	0,14(0,3)	1,8 (1, 8)	7584(±1732)	5611±1060)	358,43(±33)
Controles 4s	112 (±7)	-1,24(-1,3)	1,8 (1,7)	8457,(±1192)	-5726(±1010)	363,38(±37)
p	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
BAP 6s	113 (±7)	-0,11(0,2)	1,3(0,8)	7981(±1353)	-5668(±796)	349,4(±46)
Controles 6s	118 (±12)	-2,08(-1,6)	0,5 (0,5)	8982(±1629)	-6862(±1278)	370(±29)
p	ns	<0,05	ns	<0,05	ns	ns
BAP 8s	113 (±9)	-0,34(-0,1)	1,6 (1,8)	7537 (±1836)	-5654(±807)	356,45(±31)
Controles 8s	118 (±8)	-1,06(-1)	1,5 (1,1)	8259(±2129)	-6725(±926)	387,3(±24)
p	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

dP/dT+: derivada da pressão sistólica em função do tempo; dP/dT- derivada da pressão diastólica em função do tempo; FC: frequência cardíaca;PdVE: pressão diastólica do VE; PsVE: pressão sistólica do VE; s: semanas após cirurgia s: semanas após cirurgia, p: nível de significância estatística ; n: numero de animais analisados em cada tempo e grupo. ns: diferença não significante entre os grupos ou subgrupos. PdFVE pressão diastólica final do VD, Pressões em mmHg.

4.8- Expressão de genes no modelo de BAP

A expressão dos 46 genes será mostrada em grupos relacionados conforme modulação funcional esperada e descrita na Tabela 1. Os dados completos com as expressões obtidas de cada gene dentro do seu grupo de função, separados nos subgrupos de tempo e tipo de abordagem estão em tabelas no anexo 2.

O aumento da expressão dos genes de ambos os ventrículos nos animais com BAP em relação aos controles será descrito conforme significância estatística. (tabelas 14 e 16).

Determinada função foi considerada com aumento da expressão se o número de genes alterados for ao menos 50% dos genes daquele grupo (tabelas 15 e 17).

4.8.1- Análise da expressão gênica do VD

A análise da expressão gênica no VD foi feita em 25 animais com BAP e 25 animais controles (figura 1). Com 72 horas de BAP, em comparação aos controles, foi observado no VD aumento significativo ($p < 0,01$ a $0,001$) da atividade de genes relacionados a diversas funções, exceto os relacionados a angiogênese, ao estresse oxidativo e a apoptose (Tabela 14 e anexo 2). Com 2 semanas de BAP foi observado aumento significativo ($p < 0,05$ a $0,001$) em relação aos controles da atividade dos genes relacionados às mesmas funções observadas com 72 horas, agora com acréscimo dos genes relacionados à apoptose e angiogênese (Tabela 14). Com 4 semanas de BAP não houve aumento significativo da expressão de atividade dos genes estudados, exceto o grupo de genes relacionados à angiogênese, ($p < 0,05$ a $0,001$) (Tabela 14). Com 6 semanas de BAP foi observado, em relação aos controles, aumento significativo ($p < 0,05$ a $0,001$) da expressão dos genes relacionados a todas as funções celulares analisadas (Tabela 14). Com 8 semanas, nos animais com BAP em relação aos controles, não foi observado aumento significativo da expressão dos genes relacionados a hipertrofia e angiogênese, mas sim das demais expressões gênicas analisadas ($p < 0,05$ a $0,001$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Genes com aumento significativo da expressão no VD em relação aos controles em cada um dos tempos de BAP e conforme a função celular exercida

Função dos genes	72 horas	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
Matriz Extracelular	col3a1	col3a1, col1a1,	col1a1	col1a1, Map3k2	Map3k2, Mnp9
Hipertrofia	Nppa e Nppb	ACE,Nppa e Nppb	Edn1	IGF 1, Agr1a, Ace2 e Prkcg	Nenhum
Angiogênese		Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
Estresse oxidativo	Nenhum	Nenhum	CAT e Hspa1a	GPX4,CAT e Sod1	Sod1
Apoptose	Nenhum	HK1 AKt1	HK1	Bax, AKt1 Mapk14, Fas, HK1	Bax, Mapk14 e Mapk1
Cinética do cálcio	Atp2a2 e Slac8a1	Atp2a2, Slac8a1 e Casq2	Slac8a1	Atp2a2, Ryr 2, Slac8a1 e Casq2	Pin e Atp2a2
Metabolismo celular	Tp53, Ucp2 e Ndufa3	Tp 53 e Ucp2	Tp 53, Ucp2, Shamlc2a1 e Ucp2	Ndufa3	Ndufa3 e Shamlc2a1
Fenótipo fetal	Myh6	Myh6	Myh7	Myh7	Myh7
Inflamação	Tnf e Tnfrsfla	Tnfrsfla	IL-6	Tnf	Tnf, IL-6 e Tnfrsfla

Os grupos de funções com 50% ou mais de genes com aumento significativo da expressão nos animais com BAP em relação aos controles foram hipertrofia com 2 semanas, estresse oxidativo com 4 e 6 semanas, apoptose com 6 e 8 semanas; cinética do cálcio com 2 e 6 semanas; fenótipo fetal em todos os subgrupos analisados; inflamação com 72 hs, 2 e 8 semanas (Tabela 15).

Tabela 15 – Número de genes com aumento significativo da expressão de cada função no VD em cada subgrupo de tempo nos animais com BAP

Função	N	72 hs	2 s	4 s	6 s	8 s
Matriz Extracelular	7	1	2	1	2	2
Hipertrofia	13	1	7	1	5	0
Angiogênese	1	0	0	0	0	0
Estresse oxidativo	4	0	0	2	3	1
Apoptose	6	0	2	1	5	3
Cinética de Cálcio	5	2	3	1	4	2
Metabolismo	6	2	1	2	2	2
Fenótipo Fetal	2	1	1	1	1	1
Inflamação	3	2	1	1	1	3

N: número total de genes estudados em cada função; hs: horas; s: semanas.

Em vermelhos os grupos com mais de 50% de genes com aumento de expressão

4.8.2- Análise da expressão gênica do VE

A análise da expressão gênica do VE foi feita em 20 animais com BAP e 20 animais controles em todos os tempos, exceto no grupo 72hs (Figura 1). Com 2 semanas de BAP houve no VE aumento significativo da atividade dos genes relacionados à matriz extracelular, hipertrofia, estresse oxidativo e apoptose, em relação aos controles (p 0,001 a 0,05) (Tabela 16). Com 4 semanas de BAP houve no VE aumento significativo da expressão de genes em todas as funções, exceto a expressão de genes relacionados à inflamação (p <0,001 a 0,05) (Tabela 16). Com 6 semanas de BAP houve no VE aumento significativo apenas dos genes relacionados a inflamação (p <0,05) e com 8 semanas aumento significativo da expressão dos genes de todas as funções exceto angiogênese (p <0,001 a 0,05) (Tabela 16).

Tabela 16 – Genes com aumento significativo da expressão no VE em relação aos controles em cada um dos tempos de BAP e conforme a função exercida

Função genes	72 horas	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
Matriz Extracelular	NR	col3a1, Tgf, col1a1	col3a1, Tgf, col1a1, Mnp9	Gapdh VE	Gapdh VE, col3a1 e col1a1
Hipertrofia	NR	ACE: Nppa, Nppb, Agr1a	IGF1, Nppa, Nppb, Ace2, Cabin1, Edn1	nenhum	Prkca, Ace2, Prkcb, Edn1
Angiogênese	NR	nenhum	Vegfa	nenhum	nenhum
Estresse oxidativo	NR	HShampa1a	HShampa1a e Shamod1	nenhum	GPX4 e Shamod1
Apoptose	NR	Bax	Bax, FaSham e Mapk1	nenhum	FaSham HK 1 AKt1
Cinética do cálcio	NR	nenhum	CaShamq2	nenhum	Pin,Slac8a1,At p2a2,Casq2,R yr2
Metabolismo celular	NR	nenhum	Tp 53 e Ucp2	nenhum	Ucp2,Ndufa3 e Shamlc2a1
Fenótipo fetal	NR	nenhum	Myh7	nenhum	Myh7
Inflamação	NR	nenhum	nenhum	IL-6	IL-6

NR: não realizado

Os grupos de funções com 50% ou mais de genes com aumento significativo da expressão nos animais com BAP em relação aos controles foram os relacionados à matriz extracelular com semanas 2 e 4, à angiogênese com 4 semanas; ao estresse oxidativo e apoptose com 4 e 8 semanas, à cinética do cálcio e metabolismo com 8 semanas e ao fenótipo fetal com 4 e 8 semanas (tabela 17).

Tabela 17 – Número de genes com aumento significativo da expressão no VE em cada subgrupo de tempo nos animais com BAP

Função	N	2 s	4 s	6 s	8 s
Matriz Extracelular	7	4	6	0	3
Hipertrofia	13	4	6	0	4
Angiogênese	1	0	1	0	0
Estresse oxidativo	4	1	2	0	2
Apoptose	6	1	3	0	3
Cinética de Cálcio	5	0	1	0	5
Metabolismo	6	0	2	0	3
Fenótipo fetal	2	0	1	0	1
Inflamação	3	0	0	1	1

s: semanas. Em vermelhos os grupos com mais de 50% de genes com aumento de expressão

2- DISCUSSÃO

O modelo animal utilizado foi eficiente em produzir estenose significativa da artéria pulmonar (9) com mortalidade aceitável (19,9%) e menor que os estudos de indução de infarto do miocárdio após oclusão total da artéria coronária esquerda realizados em nosso laboratório (22). Conforme dados de literatura, modelos com sobrecarga pressórica isolada teriam menores taxas de mortalidade e de desenvolvimento de falência cardíaca em relação aos modelos que mimetizam hipertensão pulmonar (5, 41, 42, 43). Nestes, níveis maiores de fibrose no VD, com diminuição da densidade capilar e redução nos fatores de modulação do fenômeno de estresse oxidativo, diminuição do NRF2 e seu gene alvo HO-1 seriam determinantes para a maior incidência de insuficiência cardíaca (41).

No presente estudo, a estenose da artéria pulmonar atingiu gradientes de pressão avaliados pelo ecocardiograma Doppler bastante elevados que foram acompanhados de elevação da pressão sistólica do VD ao estudo hemodinâmico e de repercussão nas cavidades cardíacas. Entretanto, a sobrecarga pressórica isolada não determinou insuficiência cardíaca direita ou esquerda, conforme avaliado pelo peso total e seco do fígado e dos pulmões, ao contrário de outros estudos que observaram insuficiência cardíaca (41, 42). A evolução para insuficiência cardíaca em pacientes com hipertensão pulmonar e sobrecarga de VD em humanos é variável; há pacientes que rapidamente evoluem para disfunção cardíaca e outros com o mesmo quadro, mas que se mantêm sem falência cardíaca (43,44). A hipótese mais abrangente revela que a interação dos mecanismos de estimulação neuro-hormonal, estresse oxidativo, inflamação, isquemia e os de morte celular programada (apoptose), ativados simultaneamente na situação de sobrecarga pressórica, se intensificam com a persistência do estímulo e determinam a instalação da insuficiência ventricular direita.

As alterações estruturais determinantes de desadaptação miocárdica do VD foram observadas no modelo estudado e um tempo de observação mais prolongado que as 8 semanas do estudo poderia eventualmente mostrar acentuação deste quadro com potencial de instalação da IC direita. Os sinais de remodelamento das cavidades direitas foram observados no estudo morfológico e também com ecocardiograma.

Houve aumento significativo do peso do átrio direito e aumento da área do AD pelo ecocardiograma com 2, 4, 6 e 8 semanas dos animais BAP em relação aos controles e do peso do VD em todos os subgrupos de tempo analisados. O aumento do peso do VD nos animais com BAP parece ter sido causado pelo aumento da espessura miocárdica (46) uma vez que o ecocardiograma mostrou que o diâmetro diastólico só foi significativamente maior que o grupo controle apenas com 8 semanas de BAP, enquanto a espessura miocárdica foi significativamente maior desde de 4 semanas.

A análise histológica demonstrou o processo de adaptação do VD, com o aumento significativo do volume do núcleo dos miócitos em todos os tempos, com maiores valores com 72hs e 2 semanas, simultâneo com a elevação da expressão de genes associados com hipertrofia para 2 semanas. Estes achados de maiores níveis de hipertrofia nos tempos mais precoces contrariam o senso comum de quanto maior o tempo de BAP maiores hipertrofias seriam alcançadas(46). Entretanto, o aumento do volume nuclear denota aumento da atividade celular logo após a BAP para produzir hipertrofia e se adaptar à condição da sobrecarga promovida.

A análise histológica também revelou aumento da fibrose miocárdica nos animais com 4, 6 e 8 semanas de seguimento de BAP em relação aos controles, acompanhada de maior número de genes com expressão significativa para apoptose em 6 e 8 semanas. Nestes mesmos subgrupos foi possível notar alterações significantes de variáveis de função sistólica do VD ao ecocardiograma. A VPAVD e a onda S' foram menores que os controles nos tempos 2, 4, 6 e 8 semanas, coincidente com a fibrose com 4, 6 e 8 semanas indicativos de disfunção sistólica incipiente apesar da não variação dos parâmetros de função sistólica do VD ao estudo hemodinâmico, que mostram capacidade preservada de gerar força, inclusive com dP/dT+ aumentada em relação aos controles.

A interpretação da função diastólica do VD deve ser feita à luz da comparação com o grupo controle e em paralelo com os dados disponíveis para o ventrículo esquerdo. Há poucos dados de análise da função diastólica do VD ao ecocardiograma na literatura (47). Conforme diretriz recente de análise de função diastólica do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma em humanos ao menos 3 parâmetros devem estar alterados para o diagnóstico de disfunção ou de aumento da pressão diastólica; são

eles: aumento do volume do átrio esquerdo, da pressão sistólica pulmonar, redução das ondas E' septal ou lateral e aumento da relação E/E' (73). No presente estudo devemos considerar que nos animais com BAP já há alteração miocárdica estabelecida. Dos parâmetros indicativos de aumento da pressão diastólica podemos dizer com segurança que nos animais com BAP a pressão sistólica do VD era aumentada, houve claro aumento do átrio direito e relação E/E' esteve significativamente aumentada com 72hs, 6 e 8 semanas. Assim dos 4 parâmetros analisados, três foram alterados, e portanto, podemos considerar que ao ecocardiograma houve aumento da pressão diastólica, coincidente com dados da literatura (39, 40). Esta elevação da relação E/E' do VD coincidiu com maior número de genes com expressão aumentada e relacionados com a cinética do cálcio e o estresse oxidativo. Vale considerar, entretanto, que os parâmetros obtidos com estudo invasivo mostraram pressões diastólicas preservadas nos animais com BAP em relação aos controles e a dP/dT negativa foi até significativamente melhor nos animais com BAP o sugere relaxamento melhor do VD. Entretanto, esta variável pode não refletir o desempenho miocárdico como já observado em modelos de hipertrofia do VE com sobrecarga pressórica por estimulação beta adrenérgica; neste estudo a contração e o relaxamento do músculo papilar foram diminuídos, refletindo o miocárdio alterado, mas com o desempenho sistólico global da câmara preservado (71).

Na avaliação da expressão gênica relacionada ao fenótipo fetal existe uma transição entre o padrão adaptado para a fase de desadaptação, já relatado em diversos modelos de injúria, decorrente da mudança no padrão das cadeias de miosina leve padrão α (MHC – α) para cadeias de miosina pesada padrão β (MHC – β) nos cardiomiócitos (42,67). Em seres humanos, o ventrículo direito possui de 25 a 34% das cadeias de miosina alfa (MHC- α) e o restante de cadeias beta (MHC- β). Esta última tem menor atividade de ATP em relação a MHC- α , portanto, o decréscimo da cadeia alfa contribuiria para queda no desempenho sistólico (44). No presente estudo, o predomínio de padrão alfa na expressão fetal ocorreu nos tempos precoces de 72hs e 2 semanas, já o padrão beta (o menos favorável) esteve presente nos grupos 4, 6 e 8 semanas (tabela 14) coincidente aos tempos de surgimento de fibrose na histologia e de queda da função do VD ao ecocardiograma. A correlação do aparecimento da

fibrose com a queda da função é conhecida na literatura (3,4,41) e isto foi observado no VD do presente estudo com a observação concomitante da mudança no padrão de expressão gênica para beta de maneira concomitante. Os genes do grupo inflamação apresentaram com expressão aumentada em todos os tempos de BAP, com maior número de genes no tempo 72hs e 8 semanas, refletindo o estado mais agudo da injúria e o com maior exposição temporal.

As alterações no VD foram acompanhadas de modificações no VE, como aumento do volume do núcleo dos cardiomiócitos, fato já observado em outros estudos experimentais (47,70,). Em humanos, o fato oposto já foi observado, ou seja hipertrofia das fibras miocárdicas do VD em doenças como estenose aórtica e hipertensão arterial sistêmica que podem cursar com hipertrofia do VE (60,72). Nestes relatos, a gravidade do quadro correlacionou-se com a intensidade da hipertrofia e fibrose em ambos os ventrículos, assim como neste estudo, e estes dados confirmam a tese de interdependência das câmaras ventriculares, que apesar de possuírem origens embriológicas distintas estão submetidas aos mesmos estímulos hemodinâmicos, humorais e neurais nas diversas situações da fisiológicas e anormais e, portanto, exibem respostas exclusivas mas sempre concomitantes. A fibrose no VE foi descrita em pacientes com tetralogia de Fallot (56, 59). Há relato de pior prognóstico em situações de sobrecarga pressórica esquerda quando do surgimento da fibrose (63); no modelo aqui apresentado houve aumento da fibrose do VE de forma progressiva nos animais com BAP, porém com significância estatística em relação aos controles na 2ª e na 8ª semanas.

A avaliação anatômica das cavidades cardíacas esquerdas nos animais BAP com ecocardiograma não revelou alterações expressivas. Em relação à função sistólica foi observado valor significativamente menor da VPAVE com 72 horas nos animais com BAP em relação aos controles. Possivelmente isto foi em decorrência da mudança aguda e intensa na geometria e forma do VD imediatamente após a BAP que pode ter induzido uma desadaptação transitória do VE. Esta variação não ocorreu nos demais subgrupos na análise ecocardiográfica. Os dados hemodinâmicos invasivos da função sistólica do VE mostrou que a dP/dT positiva nos animais com BAP foi significativamente menor que nos controles apenas com 6 semanas; nos demais

tempos de análise a dP/dT positiva foi menor no grupo com BAP, porém sem diferença significativa. Talvez outros métodos de análise não invasivos como a deformação miocárdica ao ecocardiograma pudessem detectar esta nuance de modificação observada ao estudo hemodinâmico invasivo. Entre os parâmetros de função diastólica do VE analisados no presente estudo somente o TRIV e o TDE foram alterados nos animais com BAP em relação aos controles, o tamanho do átrio esquerdo avaliado pelo diâmetro anteroposterior não se alterou de forma significativa nos animais com BAP em relação aos controles e a onda E', e consequentemente a relação E/E', não foram analisadas. Desta forma, num mesmo paralelo feito para a função diastólica do ventrículo direito, a função diastólica do VE ao ecocardiograma foi limitada e não se pode afirmar sobre existência de disfunção diastólica. As alterações do TRIV e TDE observadas foram também descritas em outros estudos o que pode ter algum significado considerando-se o tempo de seguimento (47,69). Ao estudo invasivo foi observado que a PDVE foi mais elevada nos animais com BAP em relação aos controles com 6 semanas, porém ainda dentro da normalidade.

No VE, outros estudos também observaram maior expressão de genes nos animais com BAP em relação aos controles (36,51). A expressão dos genes relacionados à matriz extracelular, hipertrofia, angiogênese, estresse oxidativo, apoptose e também do fenótipo fetal com maior expressão do gene β -MHC da cadeia beta da miosina (a menos eficiente) ocorreu de forma mais intensa com 4 e 8 semanas, simultaneamente ao aumento do peso do VE. A expressão dos genes relacionados com o metabolismo celular e a cinética de cálcio no VE foi mais intensa apenas com 8 semanas de BAP em relação aos controles.

Estes resultados sugerem efeito da hipertrofia do VD no VE detectado pelas alterações histológicas e genéticas, sem um comprometimento funcional expressivo do VE ao menos até 8 semanas de BAP. Alterações do VE em associação com comprometimento do VD já foram demonstradas na literatura em estudos de coelhos com BAP; neste estudo houve disfunção diastólica do VE com fração de ejeção preservada, e índice de performance miocárdica aumentado nos animais BAP (37). Um estudo em humanos com doença pulmonar obstrutiva crônica por meio de ressonância magnética demonstrou redução na função do VE em relação aos seus controles (69).

Algumas limitações do estudo devem ser apontadas. Um tempo maior de análise, talvez até 12 semanas de BAP, poderia permitir o aparecimento de insuficiência cardíaca ou uma análise mais ampla do processo de remodelamento dos ventrículos. Um grupo de animais com BAP poderia ter sido mantido em observação para estudo da história natural da hipertrofia do VD. Isto, porém, não foi parte dos objetivos do estudo. Na literatura, os estudos publicados até o momento tiveram acompanhamento de tempos variados de 3 a 8 semanas (37, 67) e a insuficiência cardíaca também não foi detectada. Entretanto em estudos de sobrecarga de VE em ratos com 15 semanas de bandagem da aorta ocorreram claros sinais de IC (15). Outra limitação foi não ter realizado as análises de expressão gênica do VE e estudo hemodinâmico nos grupos com 72 horas após a BAP e seus controles. Isto deveu-se à restrição técnica para realização destas análises.

3- CONCLUSÃO

- Ratos submetidos a BAP apresentaram remodelamento do VD compatível com hipertrofia. Estas alterações foram mediadas por aumento da expressão de diversos genes e acompanhada de alterações funcionais, coincidentes com o surgimento de fibrose.
- As variáveis estruturais do VD como peso, espessura miocárdica, volume nuclear do miócito e grau de fibrose, modificaram-se conforme o tempo de exposição à BAP e tiveram relação com variações na expressão gênica, destacando a mudança de padrão alfa para beta dos tempos iniciais para os mais tardios.
- O estudo sugere que o VE desenvolveu alterações histológicas acompanhadas de modificações na expressão gênica simultâneas às alterações encontradas no VD.

O protocolo para o desenvolvimento desta tese foi aprovado pelo comissão de Ética no uso de Animais anexo B , e este estudo teve financiamento parcial pela Fapesp Processo 200013/05111-5.

Esta tese foi estruturada segundo as Normas Para Teses e Dissertações [Internet]. 2a ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [cited Year Month Day]. Available from: <http://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertações>

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Baumgartner H, Bonhoeffer P, De Groot NM, de Haan et al *Task Force on the Management of Grown-up Congenital Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC); Association for European Pediatric Cardiology (AEPC); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG)*. Eur Heart J. 2010 Dec; 31(23): 2915-57.
- 2 Theofilos Koletyis, Antonios P.Vlahos, Maria Louka, et al. *Characterization of a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension* Hellenic J Cardiol 48: 206-210, 2007
- 3 Matthijs J.Faber, Michiel Dalinghaus, Inge M.Lankhuizen, et al. *Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291:1580-1586, 2006
- 4 Boudewijn P. J. Leeuwenburgh, Willem A. Helbing, eta al *Effects of acute left ventricular unloading on right ventricular function in normal and chronic right ventricular pressure– overloaded lambs*. J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 125:481-90
- 5 Harm J. Bogaard, Ramesh Natarajan, Scott C. et al *Chronic Pulmonary Artery Pressure Elevation Is Insufficient to Explain Right Heart Failure*. Circulation 2009; 120; 1951-1960.
- 6 Peter Pokreisz, Glenn Marsboom, and Stefan Janssens. *Pressure overload induced right ventricular dysfunction and remodeling in experimental pulmonary hypertension:*

the right heart revisited. European Heart Journal Supplements 2007; 9: H75–H84.

7 Maytinee Kittipovanonth, Diego Bellavia, et al. *Doppler Myocardial Imaging for Early Detection of Right Ventricular Dysfunction in Patients With Pulmonary Hypertension*. J Am Soc Echocardiogr 2008; 21:1035-1041.

8 Matthijs J. Faber, Michiel Dalinghaus, Inge M. et al *Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: Correlations with the degree of hypertrophy* Proteomics 2005, 5, 2519–2530

9 Rockman HA, Ono S, Ross RS, Jones LR, et al. *Molecular and physiological alterations in murine ventricular dysfunction*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 2694–2698, 1994

10 Natia Qipshidze, Neetu Tyagi, Naira Metreveli, et al *Autophagy mechanism of right ventricular remodeling in murine model of pulmonary artery constriction* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012 February 1; 302(3): H688–H696

11 Binkhorst P.F.M, Kuipers H, Heymans et al *Exercise-induced focal skeletal muscle fiber degeneration and capillary morphology*. J Appl Physiol, 66:2857-65,1989.

12 Takashi Urashima, Mingming Zhao, Roger Wagner, et al *Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 September; 295(3): H1351–H1368.

13 Henning Witt, Carola Schubert, Juliane Jaekel, et al *Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice* J Mol Med. 2008 September; 86(9): 1013–1024.

14 Jennifer I. Drake, Herman J. Bogaard, Shiro Mizuno, et al *Molecular Signature of a Right Heart Failure Program in Chronic Severe Pulmonary Hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol Vol 45. pp. 1239–1247, 2011

- 15 Dolgilevich SM, Siri FM, Atlas SA, Eng C. *Changes in collagenase and collagen gene expression after induction of aortocaval fistula in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Jul; 281(1): H207-14.
- 16 Molina EJ, Gupta D, Palma J, Gaughan JP, Macha M. *Right ventricular beneficial effects of beta adrenergic receptor kinase inhibitor (bARKct) gene transfer in a rat model of severe pressure overload*. Biomedicine & Pharmacotherapy 2009 Jun; 63(5): 331-6.
- 17 Johns T, Olson B. Experimental myocardial infarction I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954; 140(5):675-82.
- 18 TOYODA, Y.; MASYOSHI, O.; MOHAMMED, A.K. *A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration*. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., v.115, p.1.367-1.373, 1998.
- 19 Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, et al A. *Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography*. Eur. J Echocardiogr 2009; 10(2): 165-93. Ex 27
- 20 Bjornerheim R, Groggaard HK, Kjekshus H, et al *High frame rate Doppler echocardiography in the rat: an evaluation of the method*. Eur J Echocardiogr. 2001 Jun; 2(2): 78-87.
- 21 Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, Campos O, Carvalho AC, De Paola AA, Fischer C, Tucci PF, Moises VA. *Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography*. J Am Soc Echocardiogr. 2005 May; 18(5):454-60.
- 22 Moisés VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos Fº O, Andrade JLD, Carvalho ACC, Tucci PJF. *Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography*. Arq Bras Cardiol. 2000; 75:131-6

- 23 Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Campos O, Tucci PJ, Moises VA. *Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats*. Braz J Med Biol Res. 2006; 39(5): 687-95.
- 24 Maxim Hardziyenka,, Maria E. Campian, H. A. C. M. et al. *Sequence of Echocardiographic Changes During Development of Right Ventricular Failure in Rat* J Am Soc Echocardiogr 2006; 19:1272-1279.
- 25 Lawrence G. Rudski, MD, FASE, Chair, Wyman W. Lai, et al *Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography Endorsed by the Euro Assoc of Echo, a registered branch of the Euro Society of Cardio, and the Canada Soc of Echo* J Am Soc Echocardiogr 2010;23:685-713.
- 26 Li Y, Li SY, Li JS, Deng L, Tian YG, et al *A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection*. Br J Pharmacol. 2013 Jul;169(5):953-62.
- 27 Jonas D. Baandrup, Lars H. Markvardsen, Christian D. et al *Pressure Load: The Main Factor for Altered Gene Expression in Right Ventricular Hypertrophy in Chronic Hypoxic Rats*. PLoS ONE www.plosone.org January 2011 Volume 6 Issue 1 e15859
- 28 Uffe K. Schou, Christian D. Peters, Soo Wan Kim, et al *Characterization of a rat model of right-sided heart failure induced by pulmonary trunk banding* Journal of Experimental Animal Science 43 (2007) 237–254.
- 29 Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. 65: p. 45-79.
- 30 Morisco, C., et al., *Is treating cardiac hypertrophy salutary or detrimental: the two faces of Janus*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284(4): p. H1043-7.

- 31 Saini-Chohan HK, Dakshinamurti S, Taylor WA, et al *Persistent pulmonary hypertension results in reduced tetralinoleoyl-cardiolipin and mitochondrial complex II + III during the development of right ventricular hypertrophy in the neonatal pig heart.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Oct; 301(4): H1415-24.
- 32 Harald Kögler, Oliver Hartmann, Kirsten Leineweber, et al *Mechanical Load-Dependent Regulation of Gene Expression in Monocrotaline-Induced Right Ventricular Hypertrophy in the Rat.* Circ Res. 2003; 93:230-237; originally published online July 3, 2003
- 33 Roberto Roncon-Albuquerque Jr., Mariana Vasconcelos, et al *Acute changes of biventricular gene expression in volume and right ventricular pressure overload.* Life Sciences 78 (2006) 2633 – 2642.
- 34 Jorge Correia-Pinto, Tiago Henriques-Coelho, et al *Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.* Basic Res Cardiol (2009) 104:535–545.
- 35 Yong-Hu Fang, Lin Piao, Zhigang Hong, et al *Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle.* J Mol Med (2012) 90:31–4.
- 36 Martin U. Braun, Palma Szalai, Ruth H. Strasser, Mathias M. Borst *Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: regulation of PKC isozymes.* Cardiovascular Research 59 (2003) 658–667.
- 37 Kazuo Kitahori, Huamei He, Mitsuhiro Kawata, et al *Development of Left Ventricular Diastolic Dysfunction With Preservation of Ejection Fraction During Progression of Infant Right Ventricular Hypertrophy.* CLINICAL PERSPECTIVE Circulation Heart Fail 2009;2;599-60. bap

- 38 Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, et al *Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology.* J Am Soc Echocardiogr. 2005 Dec; 18 (12): 1440-63.
- 39 Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, et al *Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography.* J Am Soc Echocardiogr. 2010 Jul; 23(7): 685-713.
- 40 Kenneth D. Horton, RDCS, RCS, et al *Assessment of the Right Ventricle by Echocardiography: A Primer for Cardiac Sonographers.* J Am Soc Echocardiogr. 2009; 22:776-792.
- 41 Bogaard, H.J., et al *Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure.* Circulation, 2009.120(20): p.1951-60.
- 42 Bogaard, H.J., et al *The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension.* Chest, 2009.135(3): p. 794-804
- 43 Voelkel, N.F., et al *Right Ventricle in Pulmonary Hypertension.* Comprehensive Physiology, 2011. 1: p. 525-540.
- 44 Herron, T.J. and K.S. McDonald, *Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments.* Circ Res, 2002. 90(11): p. 1150-2.
- 45 Noordegraaf AV, Marcus JT, Roseboom B, Postmet al *The effect of right ventricular hypertrophy on left ventricular ejection fraction in pulmonary enphysema.* Chest 1997; 112: 640-5.

- 46 Gottdiener JS, Gay JA, Maron BJ, Fletcher RD. *Increased right ventricular wall thickness in left ventricular pressure overload: echocardiographic determination of hypertrophic response of the nonstressed ventricle.* J Am Coll Cardiol 1985; 6: 550-5.
- 47 Laks MM, Morady F, Garner D, et al. *Relaxation of ventricular volume, compliance, and mass in the normal and pulmonary arterial banded canine heart.* Cardiovasc Res 1972; 6:187-98
- 48 Henk P. J. Buermans, Everaldo M. Redout, Anja E. Schiel, et al *Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNAexpression profiles early in the development of eithercompensated ventricular hypertrophy or heart failure.* Physiol. Genomics 21:314-323, 2005. First published 22 February 2005.
- 49 Brown RD, Ambler SK, Li M, Sullivan TM, et al.*MAP kinase kinase kinase-2 (MEKK2) regulates hypertrophic remodeling of the right ventricle in hypoxia-induced pulmonary hypertension.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Jan 15; 304(2): H269-81.
- 50 Mark K Friedberg, Mi-Young Cho, Jing Li, et al *Adverse Biventricular Remodeling in Isolated Right Ventricular Hypertension is Mediated by Increased TGFβ1 Signaling and is Abrogated by Angiotensin Receptor Blockade* Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Jul 10.
- 51 Shuntaro Ikeda, Mareomi Hamada, Kunio Hiwada *Cardiomyocyte Apoptosis With Enhanced Expression Of P53 and Bax in Right Ventricle After Pulmonary Arterial Banding.*Life Sciences, Vol. 65. No. 9, pp. 925-933, 1999.
- 52 Xiao Lu, Jenny S. Choy, Zhendu Zhang, et al *Effects of local mechanical stimulation on coronary artery endothelial function and angiotensin II type 1 receptor in pressure or flow-overload.* Journal of Hypertension 2013, 31:720–729.
- 53 Erwin P. Bauer, Satoru Kuki, et al *Upregulated and Downregulated Transcription of Myocardial Genes After Pulmonary Artery Banding in Pigs.* Ann Thorac Surg 1998; 66: 527–31.
- 54 Firoozeh Farahmand, Michael F. Hill and Pawan K. Singal*Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale* Molecular and Cellular Biochemistry 260: 21–29, 2004.

- 55 Dai Katayose, Shogen Isoyama, et al *Regulation of Heme Oxygenase and Heat Shock Protein 70 mRNA Expression in the Heart by Hemodynamic Stress*. Biochemical and Biophysical Research Communications.
- 56 Chen et al. *Diffuse Fibrosis in Repaired Tetralogy of Fallot*. JACC: Cardiovascular imaging, vol. 9,no.1, 2016 January 2016:1–10
- 57 Garry, D.J. and E.N. Olson *A common progenitor at the heart of development*. Cell, 2006. 127(6): p. 1101-4.
- 58 Nogueira, J. B., et al. *"Hipertensão arterial e coração direito. Estudo hemodinâmico e ecocardiográfico."* Rev Port Cardiol 10 (1991): 837-43.
- 59 Michael R. Zile, MD, David Gregg, MD *Is Biventricular Fibrosis the Mediator of Late Complications in Tetralogy of Fallot?**editorial comment J A C C .Cardiovascular Imaging, vol . 9 , n1 2016 ISS N 1936 - 878X.
- 60 Amanuma S, Sekiguchi M, Ogasawara S, et al *Biventricular endomyocardial biopsy findings in essential hypertension of graded severity*. Postgrad Med J1994; 70: S67-S71.
- 61 Kang, P.M. and S. Izumo, *Apoptosis in heart failure: is there light at the end of the tunnel* J Card Fail, 2000. 6(1): p. 43-6.
- 62 Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. 115(3): p. 500-8.
- 63 Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. 107(7): p. 984-91.
- 64 Olivetti, G., et al *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. 336(16): p. 1131-41.

- 65 Hosenpud, J.D., S.M. Campbell, et al *Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation*. J Heart Transplant, 1989. 8(6): p. 460-4.
- 66 Thaik, C.M., et al., *Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes*. J Clin Invest, 1995. 96(2): p. 1093-9.
- 67 Bakytbek Egemnazarov, et al *Pressure Overload Creates Right Ventricular Diastolic Dysfunction in a Mouse Model Assessment by Echocardiography*. JASE July 2015 Volume 28, Issue 7, Pages 828–843.
- 68 He H, Hoyer K, , et al. *Myosin-driven rescue of contractile reserve and energetics in mouse hearts bearing familial hypertrophic cardiomyopathy-associated mutant troponin T is mutation- specific*. J Physiol 2012; 590:5371-88.
- 69 Anton Vonk Noordegraaf et al *The Effect of Right Ventricular Hypertrophy on Left Ventricular Ejection Fraction in Pulmonary Emphysema* Chest 1997; 112; 640-645
- 70 Gomez A, Unruh H, Mink SN. *Altered left ventricular chamber stiffness and isovolumetric relaxation in dogs with chronic pulmonary hypertension caused by emphysema*. Circulation 1993; 87:247-60
- 71 Serra AJ, Higuchi ML, Ihara SSM, Antonio EL, Santos MHH, Bombig MTNM, Tucci PJ. *Exercise training prevents β -adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions*. J Physiol 2010;588.:2431–2442
- 72 Krayenbuehl H, Hess OM, Monrad ES, et al. *Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement*. Circulation.1989;79:744–755
- 73 Sherif F. Nagueh, et al. *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. J Am Soc Echocardiogr 2016;29:277-314

São Paulo, 27 de abril de 2012

CEP Nº: 0103/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Jairo Montemor Augusto Silva

Disciplina/Departamento: Cardiologia

Pesquisadores associados: Ednei Luiz Antonio, Camila Trindade Picollo, Andrey Jorge Serra, Luis Felipe Neves dos Santos, Paulo Jose Ferreira Tucci, Valdir Ambrosio Moises (orientador).

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Modelo de Hipertrofia do Ventriculo Direito por bandagem da arteria pulmonar em ratos. Estudo das alteracoes nos parametros morfologicos, estruturais e funcionais. :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: O objetivo principal é estudar as alterações do processo de adaptação do ventrículo direito (VD) à estenose da via de saída e identificar os parâmetros morfológicos e funcionais, à luz da microscopia e da expressão gênica, relacionados com a evolução do remodelamento ocorrido neste modelo. O objetivo secundário será estabelecer prováveis influências das alterações do ventrículo direito e da bandagem pulmonar sobre a mecânica e o desempenho do ventrículo esquerdo (VE). O objetivo terciário será pesquisar os sinais ecocardiográficos e hemodinâmicos que possam prever um remodelamento, favorável ou desfavorável ao desempenho do VD, e aqueles associados a eventos.

RESUMO: Estudo com 80 ratos wistar, machos, 6 semanas. Anestésico: ketamina-xilasina e uretana. Analgésico-xilocaína. Eutanásia: sobrecarga anestésica.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O modelo experimental de hipertrofia por sobrecarga pressórica com bandagem da arteria pulmonar (MHVD) aplicado neste estudo possibilitará a avaliação do remodelamento do ventrículo direito, em condições que mimetizam as alterações ocorridas em situações de cardiopatias congênitas observadas em humanos, com avaliações estruturais macroscópicas e microscópicas e funcionais, ao nível celular, por meio de biologia molecular e pela análise da expressão gênica, e também global. A sobrecarga pressórica imposta pela bandagem da arteria pulmonar determina um remodelamento no miocárdio que pode evoluir até estágios de esgotamento deste processo com a instalação de quadros extremos como da Insuficiência Ventricular.

MATERIAL E MÉTODO: O estudo será composto por dois grupos experimentais: Grupo Controle: ratos submetidos à toracotomia lateral esquerda para bandagem da arteria pulmonar, mas que não sofrerão bandagem da artéria (Sham) Grupo Bandagem: ratos que serão submetidos à bandagem propriamente da arteria pulmonar. No dia 1 é realizado o ecocardiograma antes de qualquer procedimento; no dia 2 o procedimento cirúrgico (bandagem da artéria pulmonar ou simulação da mesma ("sham"). No dia 3, os animais são randomizados para os grupos de 2, 4, 6 ou 8 semanas. Na data determinada para cada grupo, será realizado novo ecocardiograma, seguido de estudo hemodinâmico e coleta de material para análises histológica e de biologia molecular.

TGLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 2412,01

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 22/4/2013 e 17/4/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

ANEXOS

Tabela 1- Genes estudados, principal ação e autores descritores.

GENE	Ação/GENE	Autor
18S	controle interno/ <i>sub unidade 18s RNAr</i>	Vários
GAPDH	Controle interno/ <i>gliceral 3 fosfato desifrogenase</i>	Vários
Col3a1	Matriz (m) extracelular <i>colágeno III tipo 1a</i>	12 Urashima T et al., 2008
Tgfb1	m extracelular/ <i>f transf. Cresc. beta</i>	12 Urashima T et al., 2008
Igf1	Hipertrofia/ <i>somatomedina c</i>	14 Drake et al., 2011
Akt	Angiog/sobrevi cel./ <i>prot qui. serina e treonina</i>	14 Drake et al., 2011
Col1a1	m extracelular/ <i>colágeno I tipo 1a</i>	12 Urashima T et al., 2008
ACE 2	Hipertrofia/ <i>enzima conversora angio. 2</i> Estresse oxidativo/ <i>hidroperóxido</i>	32 Rocon-Albuquerque et al., 2006
Gpx	<i>fosfo.</i>	31 Harald Kögler et al., 2003
Cat	Estresse oxidativo/ <i>catalase</i>	31 Harald Kögler et al., 2003
ANP	Hipertrofia/ <i>precursor hormônio natriurético a</i>	47 Buermans et al., 2005
BNP	Hipertrofia / <i>precursor hormônio natriurético b</i>	14 Drake et al., 2011
Agtr1a	Hipertrofia/ <i>Recpt AT1A de angiotensina</i>	52 64 Lu et al., 2013
Bax	Apoptose/ <i>proteína X associada ao Bcl 2</i>	35 Braun et al., 2003
PKC-α	Hipertrofia / <i>proteína quinasse C alfa</i>	35 Braun et al., 2003
MMP9	matriz extracelular/ <i>Metaloproteinase 9</i>	52 Friedberg et al., 2013
ACE	Hipertrofia/fibrose/ <i>enzima conversora angio</i>	32 Rocon-Albuquerque et al., 2006
PLB	Cinética do cálcio/ <i>fosfolambam</i>	32 Rocon-Albuquerque et 2006
Cabin1	Hipertrofia/ <i>prot ligação calcineurina 1</i>	35 Braun et al., 2003
Chp2	Hipertrofia/ <i>calcinerina like</i>	35 Braun et al., 2003
PKC-β1	Hipertrofia / <i>proteína quinasse C beta</i>	35 Braun et al., 2003
Mapk14	Apoptose/ <i>proteína quinase ativada por mitogeno14</i>	12 Urashima T et al., 2008
Fas	Morte celular/ <i>receptor de morte celular fas</i>	12 Urashima T et al., 2008
Serca 2A	Cinética do cálcio/ <i>ou ATP 2a 2</i>	32 Rocon-Albuquerque et al 2006
Hsp70	Estresse oxidativo/ <i>Heat shock 70</i>	55 Katayose et al., 1993
VEGF	Angiog/sobrev celu/ <i>F. de cres. Endot. vasc.</i>	14 Drake et al., 2011
RyR	Cinética do cálcio/ <i>receptor de rianodina 2</i>	32 Rocon-Albuquerque et al 2006
Nfatc3	Hipertrofia/ <i>fato nuclear cel ativadas calcineurinas</i>	53 Alzoubi et al., 2013
Map3k2	Hipertrofia/ <i>prot quinase ativ mitogeno 2</i>	49 Brown et al., 2013
PKC-δ	Hipertrofia/ <i>prot quinase C gana</i>	35 Braun et al., 2003
NCX1	Cinética do cálcio/ <i>trocador de sódio cálcio 8</i>	31 Kögler et al., 2003
p53	Apoptose/ <i>gene p 53</i>	51 Ikeda et al, 1999
HK1	Metabolismo celular/ <i>hexoquinase 1</i>	34 Fang et al., 2011
Tnc	m extracelular/ <i>tenascina</i>	33 Correia-Pinto et al., 2009

α -MHC	Proteína miofilamentar/ <i>cad pesada miosina 6</i>	53 Bauer et al., 1998
β -MHC	Proteína miofilamentar/ <i>cad pesada miosina 7</i>	33 Correia-P et al 2009 65 Bauer et al 1998
CSQ	Cinética do cálcio/ <i>calsequestrina 2</i>	48 Rockman et al 1994 30 Rocon-Alb et al 2006
TNF- α	Inflamação/ <i>F necrose tumoral alfa</i>	32 Rocon-Albuquerque et al., 2006
IL-6	Inflamação/ <i>interleucina 6</i>	32 Rocon-Albuquerque et al., 2006
Tnfrsf1a	Inflamação/ <i>receptor de tnf</i>	12 Urashima T et al., 2008
Edn1	Hipertrofia/ <i>endotelina</i>	33 Correia-Pinto et al., 2009
SOD	Estresse oxidativo/ <i>superóxido dismutase 1</i>	54 Farahmand e al 2004 63 Friedberg et al 2013
UCP-2	Metabolismo celular/ <i>prot desaclopadora 2</i>	14 Drake et al., 2011
PFKM	Metabolismo celular/ <i>fosfotruquinase musc.</i>	14 Drake et al., 2011
Ndufa3	Metabolismo celular/ <i>NADH desidroge. 1 alfa 3</i>	12 Urashima T et al., 2008
Mapk1	Apoptose <i>proteína quinase ativada por mitogeno 1</i>	47 Buermans et al., 2005
Taz	Metabolismo celular/ <i>taffazina</i>	30 Saini-Chohan et al., 2011
Glut1	Metabolismo celular/ <i>transpor glicose glut 1</i>	34 Fang et al., 2011

Biologia molecular expressão genica do VD (Tabela geral no anexo 2)

Quadro D2

tempo VD/ Grupo de genes e numero total genes avaliado	72HS	2 s	4 s	6 s	8 s
Matriz Celular 7 genes	4/1	5/2	5/1	6/2	6/2
Hipertrofia 13 genes	9/1	13/7	12/1	13/5	12/0
Angiogenese 2 genes	1/0	1/1	1/0	2/1	2/0
Estresse oxidativo 4 genes	1/0	2/0	4/2	4/3	4/1
Apoptose 5 genes	3/0	5/1	3/1	4/4	4/3
Cinética cálcio 5 genes	5/2	5/3	5/1	5/4	5/2
Metabolismo celular 6 genes	4/2	4/1	5/2	6/2	5/2
Fenótipo fetal 2 genes	2/1	2/1	2/1	2/1	1/1
Inflamação 3 genes	3/2	3/1	2/1	2/1	3/3

Quadro resumo D2 Biomol VD numero de genes avaliados em diferentes tempos agrupados por função x/y onde x numero de genes que tiveram expressão aumentadas em relação aos controles e Y numero de genes com expressão aumentadas e com significância em relação aos controles

Tabela 22 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Matriz extracelular na comparação entre animais com BAP e controles.

Biomol VD	Sinalização Me	Matriz extracelular						placar
media e dp/grupos	Gapdh	col 3a1	Tgf	col 1a1	Mnp9	TNC	Map3k2	7
BAP 72hs	1,188(±0,06)	5,667(±1,242)	0,644(±0,185)	1,132(±0,162)	1,024(±0,258)	1,407(±0,247)	0,903(±0,144)	4
SHAM 72hs	0,879(±0,158)	1,288(±0,21)	1,098(±0,122)	0,992(±0,031)	1,02(±0,246)	0,949(±0,036)	1,024(±0,181)	2
valor p 72hs	ns	<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	1
BAP 2s	0,879(±0,602)	2,871(±1,688)	0,743(±0,271)	1,095(±0,658)	0,674(±0,684)	8,95(±5,28)	0,928(±0,295)	5
SHAM 2s	0,409(±0,309)	0,746(±0,264)	0,791(±0,229)	0,739(±0,279)	0,724(±0,293)	1,138(±0,46)	0,906(±0,089)	2
valor p 2s	ns	<0,01	ns	ns	ns	<0,001	ns	2
BAP 4s	0,304(±0,013)	2,229(±1,276)	1,262(±0,682)	1,878(±0,674)	1,054(±0,618)	2,255(±2,101)	0,553(±0,156)	5
SHAM 4s	0,546(±0,247)	0,803(±0,115)	1,021(±0,132)	0,903(±0,225)	0,92(±0,16)	0,643(±0,219)	0,724(±0,158)	2
valor p 4s	ns	ns	ns	<0,01	ns	ns	ns	1
BAP 6s	1,573(±0,838)	1,997(±0,844)	0,991(±0,1)	1,431(±0,309)	1,761(±0,81)	1,215(±0,79)	1,379(±0,443)	6
SHAM 6s	0,725(±0,371)	0,723(±0,207)	0,997(±0,369)	0,621(±0,258)	0,882(±0,231)	0,578(±0,259)	0,898(±0,2)	0
valor p 6s	ns	ns	ns	<0,05	ns	ns	<0,05	2
BAP 8s	1,476(±1,188)	1,913(±1,327)	0,664(±0,163)	1,414(±0,303)	1,933(±0,551)	1,133(±0,274)	1,469(±0,296)	6
SHAM 8s	0,62(±0,203)	0,671(±0,269)	1,143(±0,249)	0,855(±0,174)	1,022(±0,319)	0,924(±0,092)	0,742(±0,144)	2
valor p 8s	ns	ns	ns	ns	<0,05	ns	<0,001	2

em cor abobora: expressão aumentada em grupo BAP com significância estatística
em cor verde claro: expressão aumentada em grupo BAP sem significância estatística
em cor azul claro: expressão aumentada em grupo CONTROLE sem significância estatística

Tabela 22A Comparações para expressão genica da Matriz extracelular entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VD Biomol	constitucional	matriz extracelular						placar
Genes/entre BAP	Gapdh Ve	col 3a1	Tgf	col 1a1	Mnp9	TNC	Map3k2	7
72hs/ 2s	ns	<0,001	ns	ns	ns	<0,001	ns	2
72hs/ 4s	<0,05	<0,001	<0,05	<0,05	ns	ns	<0,05	5
72hs/ 6s	ns	<0,001	ns	ns	ns	ns	<0,05	2
72hs/ 8s	ns	ns	ns	ns	<0,05	ns	<0,01	2
2s/ 4s	ns	ns	<0,05	<0,01	ns	<0,001	ns	3
2s/ 6s	ns	ns	ns	ns	<0,01	<0,001	<0,05	3
2s/ 8s	ns	ns	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,01	3
4s/ 6s	<0,01	ns	ns	ns	ns	ns	<0,001	2
4s/ 8s	<0,01	ns	<0,05	ns	<0,05	ns	<0,001	4
6s/ 8s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0

Tabela 23 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Hipertrofia e hipertrofia continuação na comparação entre animais com BAP e controles.

Biomol VD	Hipertrofia					
media e dp/grupos	IGF 1	ACE	Nppa	Nppb	Agr1a	Prkca
BAP 72hs	0,794(±0,191)	0,923(±0,224)	7,969(±0,724)	3,477(±0,727)	0,579(±0,207)	1,002(±0,286)
SHAM 72hs	0,997(±0,212)	0,963(±0,026)	1,006(±0,1)	0,836(±0,288)	1,045(±0,12)	1,009(±0,063)
valor p 72hs	ns	ns	ns	<0,001	ns	ns
BAP 2s	0,962(±0,563)	1,767(±0,984)	19,709(±17,787)	2,073(±1,497)	1,764(±1,03)	1,224(±0,966)
SHAM 2s	0,855(±0,205)	0,662(±0,202)	0,749(±0,221)	0,609(±0,337)	0,9(±0,087)	0,773(±0,184)
valor p 2s	ns	<0,01	<0,001	<0,01	ns	ns
BAP 4s	0,977(±0,384)	1,152(±0,355)	4,519(±2,887)	1,177(±0,305)	1,825(±0,316)	1,42(±0,253)
SHAM 4s	0,747(±0,199)	0,703(±0,156)	1,179(±0,312)	0,689(±0,214)	1,037(±0,429)	0,928(±0,289)
valor p 4s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 6s	1,678(±0,4)	1,764(±0,912)	2,234(±0,842)	0,648(±0,208)	2,475(±0,942)	0,666(±0,202)
SHAM 6s	1,006(±0,177)	0,899(±0,173)	0,667(±0,351)	0,505(±0,306)	1,161(±0,494)	0,541(±0,258)
valor p 6s	<0,05	ns	ns	ns	<0,01	ns
BAP 8s	0,939(±0,522)	1,207(±0,323)	0,64(±0,616)	1,668(±0,626)	0,882(±0,387)	1,142(±0,257)
SHAM 8s	0,843(±0,231)	0,956(±0,226)	0,416(±0,318)	0,708(±0,262)	0,521(±0,263)	0,759(±0,168)
valor p 8s	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Biomol VD	Hipertrofia cont.							placar
media e dp/grupos	Ace2	Cabin1	Chp2	Prkcb	Nfatc3	Prkcg	Edn1	13
BAP 72hs	0,971(±0,215)	1,309(±0,148)	1,042(±0,314)	1,296(±0,115)	1,397(±0,124)	1,143(±0,145)	1,227(±0,189)	9
SHAM 72hs	0,78(±0,155)	1,073(±0,142)	1,038(±0,02)	1,039(±0,176)	0,974(±0,05)	0,947(±0,108)	1,105(±0,061)	3
valor p 72hs	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1
BAP 2s	4,578(±3,202)	1,059(±0,407)	1,736(±0,263)	0,989(±0,462)	1,267(±0,465)	0,917(±0,271)	2,993(±1,217)	13
SHAM 2s	1,5(±0,274)	0,662(±0,196)	0,912(±0,164)	0,974(±0,101)	0,674(±0,164)	0,633(±0,209)	0,831(±0,24)	0
valor p 2s	<0,01	ns	<0,001	ns	<0,05	ns	<0,001	7
BAP 4s	0,354(±0,086)	0,839(±0,126)	0,559(±0,125)	0,749(±0,28)	0,687(±0,343)	0,786(±0,241)	1,751(±0,642)	12
SHAM 4s	0,685(±0,251)	0,651(±0,212)	0,713(±0,164)	0,71(±0,233)	0,632(±0,196)	0,54(±0,245)	0,596(±0,202)	2
valor p 4s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05	1
BAP 6s	4,101(±1,37)	0,818(±0,345)	1,546(±0,322)	1,409(±0,509)	1,29(±0,12)	1,925(±0,772)	1,188(±0,3)	13
SHAM 6s	1,171(±0,384)	0,651(±0,213)	0,767(±0,242)	1,01(±0,465)	0,786(±0,239)	0,872(±0,184)	0,769(±0,243)	0
valor p 6s	<0,01	ns	<0,001	ns	ns	<0,001	ns	5
BAP 8s	1,076(±0,618)	0,965(±0,433)	1,036(±0,504)	0,857(±0,585)	1,492(±0,364)	0,465(±0,241)	0,882(±0,485)	12
SHAM 8s	0,753(±0,248)	0,877(±0,287)	0,792(±0,226)	0,75(±0,275)	1,228(±0,381)	0,506(±0,297)	0,481(±0,26)	1
valor p 8s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0

Tabela 23A Comparações para expressão genica da Hipertrofia e Hipertrofia continuação entre os grupos BAP ao longo do tempo, que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VD Biomol	Hipertrofia					
Genes/entre BAP	IGF 1	ACE	Nppa	Nppb	Agr1a	Prkca
72hs/ 2s	ns	ns	<0,05	<0,01	<0,01	ns
72hs/ 4s	ns	ns	ns	<0,001	<0,01	ns
72hs/ 6s	<0,01	ns	ns	<0,001	<0,001	ns
72hs/ 8s	ns	ns	ns	<0,001	ns	ns
2s/ 4s	ns	ns	<0,01	ns	ns	ns
2s/ 6s	<0,01	ns	<0,001	<0,01	ns	ns
2s/ 8s	ns	ns	<0,001	ns	<0,05	ns
4s/ 6s	<0,05	ns	ns	ns	ns	<0,05
4s/ 8s	ns	ns	ns	ns	<0,05	ns
6s/ 8s	<0,01	ns	ns	<0,05	<0,001	ns

VD Biomol	Hipertrofia cont.							placar
Genes/entre BAP	Ace2	Cabin1	Chp2	Prkcb	Nfatc3	Prkcg	Edn1	13
72hs/ 2s	<0,001	ns	<0,01	ns	ns	ns	<0,001	6
72hs/ 4s	ns	<0,05	<0,01	ns	<0,01	ns	ns	5
72hs/ 6s	<0,001	<0,05	ns	ns	ns	<0,01	ns	6
72hs/ 8s	ns	ns	ns	ns	ns	<0,01	ns	2
2s/ 4s	<0,001	ns	<0,001	ns	<0,05	ns	<0,01	5
2s/ 6s	ns	ns	ns	ns	ns	<0,001	<0,001	5
2s/ 8s	<0,001	ns	<0,001	ns	ns	ns	<0,001	5
4s/ 6s	<0,001	ns	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001	ns	7
4s/ 8s	ns	ns	<0,05	ns	<0,001	ns	<0,05	4
6s/ 8s	<0,01	ns	<0,05	ns	ns	<0,001	ns	6

Tabela 24 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Angiogenese e estresse oxidativo na comparação entre animais com BAP e controles.

Biomol VD	angiogenese		placar	estresse oxidativo				placar
media e dp/grupos	Akt1	Vegfa	2	GPX4	CAT	HShampa1a	Shamod1	4
BAP 72hs	1,466(±0,312)	1,045(±0,164)	1	1,198(±0,32)	0,725(±0,216)	0,597(±0,096)	0,953(±0,191)	1
SHAM 72hs	0,938(±0,123)	1,117(±0,063)	0	1,065(±0,241)	1,049(±0,158)	0,986(±0,129)	0,976(±0,084)	3
valor p 72hs	ns	ns	0	ns	ns	ns	ns	0
BAP 2s	1,379(±0,624)	0,559(±0,154)	1	1,554(±0,385)	0,573(±0,32)	0,299(±0,222)	0,769(±0,243)	2
SHAM 2s	0,73(±0,229)	0,837(±0,097)	1	0,895(±0,238)	0,744(±0,156)	0,47(±0,276)	0,66(±0,209)	2
valor p 2s	<0,05	ns	1	ns	ns	ns	ns	0
BAP 4s	1,081(±0,457)	0,455(±0,107)	1	1,338(±0,758)	1,4(±0,087)	2,427(±1,417)	0,864(±0,302)	4
SHAM 4s	0,853(±0,224)	0,649(±0,282)	1	0,776(±0,199)	0,775(±0,27)	1,113(±0,475)	0,645(±0,211)	0
valor p 4s	ns	ns	0	ns	<0,05	<0,05	ns	2
BAP 6s	1,724(±0,418)	1,509(±0,753)	2	2,148(±0,306)	1,261(±0,47)	1,585(±0,501)	1,446(±0,467)	4
SHAM 6s	0,753(±0,25)	0,9(±0,357)	0	0,663(±0,355)	0,609(±0,269)	0,658(±0,288)	0,777(±0,223)	0
valor p 6s	<0,001	ns	1	<0,001	<0,05	ns	<0,01	3
BAP 8s	1,496(±0,212)	0,691(±0,401)	2	1,316(±0,188)	1,087(±0,462)	1,429(±0,587)	1,538(±0,324)	4
SHAM 8s	0,893(±0,156)	0,58(±0,306)	0	0,908(±0,233)	0,724(±0,184)	0,659(±0,187)	0,941(±0,138)	0
valor p 8s	ns	ns	0	ns	ns	ns	<0,05	1

Tabela 24A Comparações para expressão genica Angiogenese e estresse oxidativo entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VD Biomol	angiogenese		placar	estresse oxidativo				placar
Genes/entre BAP	Akt1	Vegfa	2	GPX4	CAT	HShampa1a	Shamod1	4
72hs/ 2s	ns	<0,05	1	ns	ns	ns	ns	0
72hs/ 4s	ns	<0,05	1	ns	<0,01	<0,001	ns	2
72hs/ 6s	ns	ns	0	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	4
72hs/ 8s	ns	ns	0	ns	ns	ns	<0,05	1
2s/ 4s	ns	ns	0	ns	<0,001	<0,001	ns	2
2s/ 6s	ns	<0,001	1	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	4
2s/ 8s	ns	ns	0	ns	<0,05	<0,05	<0,001	3
4s/ 6s	<0,05	<0,001	2	<0,01	ns	ns	<0,01	2
4s/ 8s	ns	ns	0	ns	ns	<0,05	<0,01	2
6s/ 8s	ns	<0,01	1	<0,001	ns	ns	ns	1

Tabela 25 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Apoptose na comparação entre animais com BAP e controles.

Biomol VD	apoptose					placar
media e dp/grupos	Bax	Mapk14	Fas	HK 1	Mapk1	5
72hs bap	1,243(±0,124)	0,936(±0,167)	1,338(±0,096)	1,445(±0,114)	1,101(±0,196)	3
72hs sham	0,898(±0,196)	0,956(±0,03)	0,884(±0,139)	0,781(±0,27)	1,008(±0,039)	0
p value	ns	ns	ns	ns	ns	0
2s bap	0,859(±0,351)	0,846(±0,203)	1,993(±0,232)	1,133(±0,469)	0,814(±0,598)	5
2s sham	0,53(±0,244)	0,58(±0,215)	1,096(±0,112)	0,6(±0,232)	0,604(±0,269)	0
p value	ns	ns	ns	<0,05	ns	1
4s bap	0,834(±0,08)	0,547(±0,257)	0,683(±0,215)	1,531(±0,164)	1,03(±0,264)	3
4s sham	0,681(±0,23)	0,564(±0,286)	0,697(±0,165)	0,997(±0,328)	0,682(±0,238)	0
p value	ns	ns	ns	<0,001	ns	1
6s bap	1,676(±0,374)	1,625(±0,433)	1,996(±1,644)	1,617(±0,261)	0,891(±0,087)	4
6s sham	0,964(±0,046)	0,692(±0,274)	1,099(±0,594)	0,789(±0,421)	0,815(±0,312)	0
p value	<0,01	<0,001	<0,01	<0,001	ns	4
8s bap	1,379(±0,563)	1,683(±0,467)	0,852(±0,331)	1,21(±0,401)	1,536(±0,128)	4
8s sham	0,535(±0,235)	0,832(±0,176)	1,138(±0,484)	0,818(±0,264)	1,18(±0,156)	1
p value	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,05	3

Tabela 25A Comparações para expressão genica Apoptose entre os grupos BAP ao longo do tempo ,que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VD Biomol	apoptose					placar
Genes/entre BAP	Bax	Mapk14	FaSham	HK 1	Mapk1	5
72hs/ 2s	ns	ns	ns	ns	ns	0
72hs/ 4s	ns	<0,05	ns	ns	ns	1
72hs/ 6s	ns	<0,01	<0,05	ns	ns	2
72hs/ 8s	ns	<0,01	ns	ns	ns	1
2s/ 4s	ns	ns	<0,01	ns	ns	1
2s/ 6s	<0,001	<0,001	ns	<0,05	ns	3
2s/ 8s	<0,05	<0,001	<0,05	ns	<0,01	4
4s/ 6s	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	3
4s/ 8s	<0,05	<0,001	ns	ns	<0,05	3
6s/ 8s	ns	ns	<0,01	<0,05	<0,01	3

Tabela 26 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Cinética cálcio na comparação entre animais com BAP e controles.

Biomol VD	cinética cálcio					placar
media e dp /grupos	Pin	Atp2a2	Ryr2	Shamlac8a1	CaShamq2	5
BAP 72hs	1,019(±0,223)	1,635(±0,282)	0,89(±0,18)	1,795(±0,251)	1,398(±0,229)	5
SHAM 72hs	0,665(±0,195)	0,493(±0,276)	0,569(±0,221)	0,67(±0,308)	0,993(±0,045)	0
valor p 72hs	ns	<0,001	ns	<0,001	ns	2
BAP 2s	1,121(±0,353)	1,126(±0,17)	0,901(±0,275)	1,455(±0,458)	1,597(±0,456)	5
SHAM 2s	0,656(±0,27)	0,551(±0,243)	0,556(±0,223)	0,805(±0,27)	0,847(±0,156)	0
valor p 2s	ns	<0,05	ns	<0,01	<0,01	3
BAP 4s	0,993(±0,286)	0,617(±0,218)	0,877(±0,238)	1,45(±0,16)	1,335(±0,302)	5
SHAM 4s	0,628(±0,221)	0,591(±0,261)	0,63(±0,216)	0,601(±0,269)	0,928(±0,241)	0
valor p 4s	ns	ns	ns	<0,001	ns	1
BAP 6s	0,763(±0,254)	1,359(±0,372)	1,573(±0,318)	2,002(±0,406)	2,307(±0,663)	5
SHAM 6s	0,691(±0,279)	0,726(±0,365)	0,813(±0,281)	0,887(±0,225)	0,809(±0,141)	0
valor p 6s	ns	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	4
BAP 8s	1,58(±0,229)	1,528(±0,463)	1,099(±0,143)	1,244(±0,229)	1,019(±0,112)	5
SHAM 8s	0,551(±0,324)	0,76(±0,153)	0,766(±0,163)	0,881(±0,148)	0,743(±0,143)	0
valor p 8s	<0,001	<0,001	ns	ns	ns	2

Tabela 26A Comparações para expressão genica Cinética cálcio entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

Genes/entre BAP	Pin	Atp2a2	Ryr2	Shamlac8a1	CaShamq2	5
72hs/ 2s	ns	<0,01	ns	ns	ns	1
72hs/ 4s	ns	<0,001	ns	ns	ns	1
72hs/ 6s	ns	ns	<0,001	ns	<0,001	2
72hs/ 8s	<0,05	ns	ns	ns	ns	1
2s/ 4s	ns	<0,05	ns	ns	ns	1
2s/ 6s	ns	ns	<0,001	<0,05	<0,01	3
2s/ 8s	<0,05	<0,01	ns	ns	<0,05	3
4s/ 6s	ns	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001	4
4s/ 8s	<0,01	<0,001	ns	ns	ns	2
6s/ 8s	<0,001	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	5

Tabela 27 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Metabolismo celular na comparação entre animais com BAP e controles

Metabolismo celular						placar
Tp53	Ucp2	Pfkm	Ndufa3	Taz	Shamlc2a1	6
1,952(±0,21)	1,014(±0,067)	1,087(±0,224)	1,091(±0,241)	1,055(±0,296)	0,972(±0,2)	4
1,015(±0,053)	1,015(±0,015)	1,042(±0,039)	0,438(±0,294)	0,979(±0,095)	1,04(±0,203)	1
<0,001	ns	ns	<0,01	ns	ns	2
1,487(±0,524)	1,08(±0,375)	0,366(±0,075)	1,201(±0,126)	0,592(±0,18)	0,62(±0,505)	4
0,856(±0,137)	0,529(±0,261)	0,59(±0,217)	0,881(±0,294)	0,879(±0,154)	0,538(±0,248)	2
<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	1
0,628(±0,177)	2,216(±1,004)	1,006(±0,301)	1,048(±0,44)	1,156(±0,311)	3,012(±0,71)	5
0,729(±0,144)	1,218(±0,21)	0,697(±0,265)	0,594(±0,254)	0,972(±0,373)	0,887(±0,183)	1
ns	<0,001	ns	ns	ns	<0,001	2
1,395(±0,305)	1,493(±0,357)	1,17(±0,382)	1,791(±0,544)	1,155(±0,352)	1,37(±0,331)	6
0,805(±0,159)	0,81(±0,289)	0,837(±0,359)	0,886(±0,348)	0,838(±0,22)	0,935(±0,189)	0
<0,01	ns	ns	<0,01	ns	ns	2
0,51(±0,107)	1,25(±0,276)	0,648(±0,399)	2,003(±0,252)	0,667(±0,191)	1,23(±0,204)	4
0,902(±0,157)	0,72(±0,211)	0,607(±0,284)	0,743(±0,212)	0,658(±0,276)	0,547(±0,293)	1
ns	ns	ns	<0,001	ns	<0,05	2

Tabela 27A Comparações para expressão genica Metabolismo celular entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VD Biomol	Metabolismo celular						placar
Genes/entre BAP	Tp53	Ucp2	Pfkm	Ndufa3	Taz	Shamlc2a1	6
72hs/ 2s	<0,01	ns	<0,01	ns	<0,01	<0,01	4
72hs/ 4s	<0,001	<0,001	ns	ns	ns	<0,001	3
72hs/ 6s	<0,01	ns	ns	<0,05	ns	ns	2
72hs/ 8s	<0,001	ns	<0,05	<0,01	<0,05	ns	4
2s/ 4s	<0,001	<0,001	<0,01	ns	<0,05	<0,001	5
2s/ 6s	ns	ns	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001	4
2s/ 8s	<0,001	ns	ns	<0,01	ns	<0,001	3
4s/ 6s	<0,001	<0,05	ns	<0,01	ns	<0,001	4
4s/ 8s	ns	<0,01	ns	<0,001	ns	<0,001	3
6s/ 8s	<0,001	ns	<0,05	ns	<0,05	ns	3

Tabela 28 Biomol VD Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Fenótipo Fetal e Inflamação na comparação entre animais com BAP e controles.

Biomol VD	Fenótipo fetal		placar	Inflamação			placar
media e dp/grupos	Alfa-MHC	Beta-MHC	2	Tnf	IL-6	TnfrShamfla	3
BAP 72hs	1,397(±0,216)	1,023(±0,186)	2	1,457(±0,21)	1,255(±0,199)	1,693(±0,353)	3
SHAM 72hs	0,676(±0,239)	0,949(±0,039)	0	0,992(±0,094)	0,986(±0,101)	0,886(±0,111)	0
valor p 72hs	<0,01	ns	1	<0,05	ns	<0,001	2
BAP 2s	1,238(±0,135)	1,848(±1,102)	2	1,27(±0,083)	1,245(±0,136)	1,371(±0,391)	3
SHAM 2s	0,409(±0,313)	0,668(±0,26)	0	0,846(±0,225)	0,759(±0,226)	0,85(±0,095)	0
valor p 2s	<0,01	ns	1	ns	ns	<0,01	1
BAP 4s	1,246(±0,374)	4,036(±1,762)	2	0,696(±0,416)	1,249(±0,431)	1,133(±0,043)	2
SHAM 4s	0,789(±0,25)	1,248(±0,41)	0	0,652(±0,194)	0,75(±0,301)	0,875(±0,188)	0
valor p 4s	ns	<0,001	1	ns	<0,01	ns	1
BAP 6s	0,787(±0,223)	2,302(±0,696)	2	1,573(±0,465)	0,4(±0,287)	1,212(±0,08)	2
SHAM 6s	0,504(±0,334)	0,715(±0,291)	0	0,977(±0,06)	0,453(±0,299)	0,896(±0,288)	0
valor p 6s	ns	<0,05	1	<0,01	ns	ns	1
BAP 8s	0,553(±0,095)	2,487(±0,387)	2	1,306(±0,349)	1,073(±0,937)	1,668(±0,203)	3
SHAM 8s	0,612(±0,24)	0,786(±0,188)	0	0,622(±0,227)	0,609(±0,224)	0,859(±0,152)	0
valor p 8s	ns	<0,01	1	<0,01	<0,05	<0,001	3

Tabela 28A Comparações para expressão genica Fenótipo Fetal e Inflamação entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VD Biomol	Fenótipo fetal		placar	Inflamação			placar
Genes/entre BAP	Alfa-MHC	Beta-MHC	2	Tnf	IL-6	TnfrShamfla	3
72hs/ 2s	ns	ns	0	ns	ns	<0,05	1
72hs/ 4s	ns	<0,001	1	<0,001	ns	<0,001	1
72hs/ 6s	<0,01	<0,05	2	ns	<0,001	<0,01	2
72hs/ 8s	<0,05	<0,05	2	ns	ns	ns	0
2s/ 4s	ns	<0,001	1	<0,001	ns	ns	1
2s/ 6s	ns	ns	0	ns	<0,01	ns	1
2s/ 8s	ns	ns	0	ns	ns	ns	0
4s/ 6s	ns	<0,01	1	<0,001	<0,001	ns	2
4s/ 8s	ns	<0,01	1	<0,001	ns	ns	1
6s/ 8s	ns	ns	0	ns	<0,001	<0,01	2

ANEXO 3 BIOLOGIA MOLECULAR EXPRESSÃO GENICA VE

Semanas VE/ Grupo de genes e numero total genes avaliado	2 s	4 s	6 s	8 s
Matriz Celular 7 genes	7/4	7/6	6/0	5/3
Hipertrofia 13 genes	12/4	12/6	7/0	8/4
Angiogenese 2 genes	1/0	2/1	0/0	2/1
Estresse oxidativo 4 genes	4/1	4/2	1/0	4/2
Apoptose 5 genes	5/1	5/3	1/0	3/2
Cinética cálcio 5 genes	3/0	4/1	1/0	5/5
Metabolismo celular 6 genes	4/0	5/2	2/0	5/3
Fenótipo fetal 2 genes	1/0	1/1	1/0	2/1
Inflamação 3 genes	3/0	3/0	1/1	3/1

Quadro resumo 1 Biomol VE numero de genes avaliados em diferentes tempos agrupados por função x/y onde x numero de genes que tiveram expressão aumentadas em relação aos controles e Y numero de genes com expressão aumentadas e com significância em relação aos controles

Tabela 15 Biomol VE Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Matriz extracelular na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles

Biomol VE	Sinalização Me	Matriz extracelular						placar
media e dp /grupos	Gapdh Ve	col 3a1	Tgf	col 1a1	Mnp9	TNC	Map3k2	7
BAP 2s	1,512(±0,458)	7,99(±2,251)	3,794(±1,88)	7,186(±1,351)	1,109(±0,27)	3,816(±2,019)	0,955(±0,395)	7
SHAM 2s	0,803(±0,3)	0,691(±0,269)	1,139(±0,304)	0,889(±0,217)	0,883(±0,259)	1,053(±0,361)	0,827(±0,176)	0
valor p 2s	ns	<0,001	<0,05	<0,001	ns	<0,01	ns	4
BAP 4s	3,245(±2,812)	4,484(±2,042)	4,805(±2,143)	3,76(±3,361)	2,631(±1,23)	3,318(±0,967)	1,341(±0,462)	7
SHAM 4s	1,003(±0,581)	1,415(±1,025)	0,903(±0,13)	0,579(±0,274)	1,51(±0,453)	1,052(±0,591)	0,841(±0,509)	0
valor p 4s	<0,05	<0,05	<0,001	<0,05	<0,05	<0,05	ns	6
BAP 6s	0,647(±0,299)	1,296(±0,489)	0,495(±0,172)	1,298(±0,285)	1,215(±0,553)	1,295(±0,728)	0,463(±0,138)	6
SHAM 6s	0,598(±0,274)	0,883(±0,249)	0,561(±0,245)	0,933(±0,348)	1,066(±0,068)	0,871(±0,413)	0,712(±0,203)	1
valor p 6s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 8s	4,269(±2,623)	4,773(±2,046)	2,855(±0,831)	10,926(±2,353)	0,746(±0,433)	2,998(±1,063)	1,15(±0,162)	5
SHAM 8s	1,426(±0,649)	1,612(±0,496)	1,115(±0,318)	1,299(±0,883)	0,843(±0,394)	1,679(±0,632)	1,293(±0,543)	2
valor p 8s	<0,05	<0,05	ns	<0,001	ns	ns	ns	3

Tabela 15A Comparações para expressão genica da Matriz extracelular VE entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	constitucional	matriz extracelular						placar
Genes/entre BAP	Gapdh Ve	col 3a1	Tgf	col 1a1	Mnp9	TNC	Map3k2	8
Valor p 2s/ 4s	ns	<0,01	ns	<0,05	<0,01	ns	ns	3
Valor p 2s/ 6s	ns	<0,001	<0,001	<0,001	ns	<0,01	ns	4
Valor p 2s/ 8s	<0,05	<0,01	ns	<0,01	ns	ns	ns	3
Valor p 4s/ 6s	<0,05	<0,05	<0,001	ns	<0,01	<0,05	<0,01	6
Valor p 4s/ 8s	ns	ns	<0,05	<0,001	<0,001	ns	ns	3
Valor p 6s/ 8s	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	ns	<0,05	<0,05	6

Tabela16 Biomol VE Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Hipertrofia e hipertrofia continuação na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles.

Biomol VE	Hipertrofia					
media e dp /grupos	IGF 1	ACE	Nppa	Nppb	Agr1a	Prkca
BAP 2s	1,473(±0,391)	2,56(±1,929)	87,238(±47,477)	13,38(±3,03)	3,876(±2,409)	1,616(±0,475)
SHAM 2s	0,858(±0,318)	0,825(±0,204)	0,787(±0,322)	0,764(±0,305)	1,439(±0,379)	1,012(±0,401)
valor p 2s	ns	<0,05	<0,01	<0,001	<0,05	ns
BAP 4s	2,022(±1,045)	1,623(±0,836)	168,644(±69,718)	9,287(±4,279)	2,209(±0,969)	1,98(±0,933)
SHAM 4s	0,645(±0,293)	0,854(±0,439)	1,313(±0,399)	0,563(±0,22)	1,244(±0,526)	0,974(±0,489)
valor p 4s	<0,01	ns	<0,001	<0,001	ns	ns
BAP 6s	1,045(±0,13)	0,766(±0,156)	13,264(±4,184)	3,79(±1,858)	1,174(±1,122)	0,705(±0,174)
SHAM 6s	1,319(±0,633)	0,867(±0,267)	0,986(±0,138)	1,28(±0,499)	1,272(±0,645)	1,014(±0,308)
valor p 6s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BAP 8s	1,369(±0,445)	1,714(±0,551)	17,088(±2,644)	3,217(±1,064)	0,709(±0,113)	4,044(±0,487)
SHAM 8s	0,949(±0,27)	1,146(±0,11)	0,38(±0,371)	1,906(±1,183)	0,821(±0,381)	0,5(±0,262)
valor p 8s	ns	<0,05	ns	ns	ns	<0,001

Biomol VE	Hipertrofia cont.							placar
media e dp /grupos	Ace2	Cabin1	Chp2	Prkcb	Nfatc3	Prkcg	Edn1	13
BAP 2s	2,954(±1,109)	0,879(±0,145)	1,157(±0,595)	0,867(±0,267)	1,357(±1,025)	0,263(±0,111)	1,68(±1,291)	12
SHAM 2s	0,678(±0,198)	0,667(±0,291)	0,919(±0,216)	0,841(±0,188)	0,54(±0,048)	0,741(±0,22)	0,809(±0,304)	1
valor p 2s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	4
BAP 4s	4,409(±3,766)	1,907(±0,556)	0,75(±0,225)	1,622(±0,224)	1,346(±1,195)	1,182(±0,35)	2,337(±0,463)	12
SHAM 4s	0,713(±0,345)	0,941(±0,56)	0,868(±0,61)	1,285(±0,628)	0,974(±0,507)	1,081(±0,427)	1,04(±0,523)	1
valor p 4s	<0,05	<0,01	ns	ns	ns	ns	<0,05	6
BAP 6s	0,531(±0,196)	0,81(±0,239)	0,331(±0,035)	0,677(±0,143)	0,382(±0,15)	0,718(±0,774)	1,452(±0,75)	7
SHAM 6s	0,512(±0,264)	1,064(±0,073)	0,601(±0,201)	0,988(±0,209)	0,613(±0,197)	0,642(±0,197)	1,334(±0,582)	5
valor p 6s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 8s	5,177(±1,866)	1,368(±0,408)	1,031(±0,062)	1,912(±0,301)	0,919(±0,203)	0,455(±0,244)	1,558(±0,382)	8
SHAM 8s	1,309(±0,417)	1,404(±0,484)	1,234(±0,449)	1,148(±0,524)	1,233(±0,456)	0,961(±0,5)	1,042(±0,244)	3
valor p 8s	<0,01	ns	ns	<0,05	ns	ns	ns	4

Tabela 16A Comparações para expressão genica da Hipertrofia e Hipertrofia continuação entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	Hipertrofia					
Genes/entre BAP	IGF 1	ACE	Nppa	Nppb	Agr1a	Prkca
Valor p 2s/ 4s	ns	ns	<0,01	<0,05	ns	ns
Valor p 2s/ 6s	ns	<0,01	<0,05	<0,001	<0,01	ns
Valor p 2s/ 8s	ns	ns	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001
Valor p 4s/ 6s	<0,05	ns	<0,001	<0,01	ns	<0,01
Valor p 4s/ 8s	ns	ns	<0,001	<0,001	ns	<0,001
Valor p 6s/ 8s	ns	ns	ns	ns	ns	<0,001

VE Biomol	Hipertrofia cont.							placar
Genes/entre BAP	Ace2	Cabin1	Chp2	Prkcb	Nfatc3	Prkcg	Edn1	7
Valor p 2s/ 4s	ns	<0,01	ns	<0,05	ns	<0,01	ns	5
Valor p 2s/ 6s	ns	ns	<0,05	ns	ns	ns	ns	5
Valor p 2s/ 8s	ns	ns	ns	<0,001	ns	ns	ns	5
Valor p 4s/ 6s	<0,01	<0,001	ns	<0,01	ns	ns	ns	7
Valor p 4s/ 8s	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05	ns	4
Valor p 6s/ 8s	<0,01	ns	<0,05	<0,001	ns	ns	ns	3

Tabela 17 Biomol VE Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Angiogenese e estresse oxidativo na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles.

Biomol VE	angiogenese		placar	estresse oxidativo				placar
media e dp /grupos	Akt1	Vegfa	2	GPX4	CAT	HShampa1a	Shamod1	4
BAP 2s	0,721(±0,202)	0,859(±0,264)	1	1,556(±1,037)	1,179(±0,866)	2,427(±1,035)	1,369(±0,131)	4
SHAM 2s	0,84(±0,259)	0,658(±0,24)	1	1,227(±0,489)	0,611(±0,249)	0,789(±0,312)	0,916(±0,312)	0
valor p 2s	ns	ns	0	ns	ns	<0,01	ns	1
BAP 4s	1,062(±0,511)	2,003(±0,464)	2	2,234(±1,105)	1,498(±0,978)	2,618(±1,034)	1,75(±0,396)	4
SHAM 4s	0,902(±0,622)	1,147(±0,692)	0	1,033(±0,545)	0,545(±0,288)	1,292(±0,431)	1,103(±0,464)	0
valor p 4s	ns	<0,01	1	ns	ns	<0,05	<0,05	2
BAP 6s	0,576(±0,113)	0,422(±0,118)	0	0,794(±0,203)	0,291(±0,019)	0,548(±0,241)	0,558(±0,208)	1
SHAM 6s	0,662(±0,296)	0,855(±0,176)	2	0,706(±0,187)	0,359(±0,329)	0,957(±0,184)	0,925(±0,263)	3
valor p 6s	ns	ns	0	ns	ns	ns	ns	0
BAP 8s	2,414(±0,635)	0,671(±0,221)	1	5,087(±0,982)	1,599(±0,459)	1,058(±0,192)	1,628(±0,504)	4
SHAM 8s	1,447(±0,46)	0,884(±0,394)	1	1,213(±0,44)	0,974(±0,168)	0,884(±0,129)	0,961(±0,205)	0
valor p 8s	<0,05	ns	1	<0,001	ns	ns	<0,05	2

Tabela 17A Comparações para expressão genica Angiogenese e estresse oxidativo entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	angiogenese		placar	estresse oxidativo				placar
Genes/entre BAP	Akt1	Vegfa	2	GPX4	CAT	HShampa1a	Shamod1	4
Valor p 2s/ 4s	ns	<0,001	1	ns	ns	ns	ns	0
Valor p 2s/ 6s	ns	ns	0	ns	ns	<0,001	<0,01	2
Valor p 2s/ 8s	<0,001	ns	1	<0,001	ns	<0,01	ns	2
Valor p 4s/ 6s	ns	<0,001	1	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001	4
Valor p 4s/ 8s	<0,001	<0,001	2	<0,001	ns	<0,01	ns	2
Valor p 6s/ 8s	<0,001	ns	1	<0,001	<0,01	ns	<0,001	3

Tabela 18 Biomol VE Média, desvio-padrão e placar da Expressão genica para Apoptose na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles.

Biomol VE	apoptose					placar
media e dp /grupos	Bax	Mapk14	FaSham	HK 1	Mapk1	5
BAP 2s	1,664(±0,447)	0,782(±0,212)	1,235(±0,338)	1,807(±1,159)	2,091(±1,178)	5
SHAM 2s	0,879(±0,176)	0,661(±0,296)	0,851(±0,356)	0,805(±0,267)	0,958(±0,198)	0
valor p 2s	<0,05	ns	ns	ns	ns	1
BAP 4s	1,75(±0,594)	1,253(±0,589)	2,052(±1,091)	1,387(±0,8)	2,616(±1,824)	5
SHAM 4s	0,922(±0,559)	0,798(±0,552)	0,638(±0,223)	0,697(±0,411)	0,876(±0,339)	0
valor p 4s	<0,05	ns	<0,01	ns	<0,05	3
BAP 6s	0,698(±0,182)	0,4(±0,14)	0,495(±0,135)	0,791(±0,147)	0,658(±0,141)	1
SHAM 6s	1,066(±0,204)	0,756(±0,207)	0,838(±0,177)	0,528(±0,262)	0,85(±0,092)	4
valor p 6s	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 8s	0,89(±0,037)	1,051(±0,298)	2,43(±0,795)	5,608(±1,719)	1,732(±0,626)	3
SHAM 8s	1,134(±0,472)	1,113(±0,388)	1,193(±0,314)	1,128(±0,144)	0,971(±0,186)	0
valor p 8s	ns	ns	<0,05	<0,001	ns	2

Tabela 18A Comparações para expressão genica Apoptose entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	apoptose					placar
Genes/entre BAP	Bax	Mapk14	FaSham	HK 1	Mapk1	5
Valor p 2s/ 4s	ns	ns	ns	ns	ns	0
Valor p 2s/ 6s	<0,01	ns	ns	ns	ns	1
Valor p 2s/ 8s	<0,05	ns	<0,01	<0,001	ns	3
Valor p 4s/ 6s	<0,01	<0,01	<0,01	ns	<0,01	4
Valor p 4s/ 8s	<0,001	ns	ns	<0,001	ns	3
Valor p 6s/ 8s	ns	<0,05	<0,001	<0,001	ns	3

Tabela 19 Biomol VE Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Cinética cálcio na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles.

Biomol VE	cinética cálcio					placar
media e dp /grupos	Pin	Atp2a2	Ryr2	Shamlac8a1	CaShamq2	5
BAP 2s	0,553(±0,173)	1,209(±1,235)	1,393(±1,191)	0,655(±0,342)	1,781(±1,015)	3
SHAM 2s	1,064(±0,458)	0,968(±0,399)	0,892(±0,125)	0,871(±0,279)	1,053(±0,369)	2
valor p 2s	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 4s	1,137(±0,606)	1,304(±1,382)	1,808(±1,207)	2,3(±1,181)	2,26(±1,081)	4
SHAM 4s	1,388(±0,299)	1,09(±0,534)	0,82(±0,173)	0,925(±0,34)	1,112(±0,49)	1
valor p 4s	ns	ns	ns	ns	<0,05	1
BAP 6s	1,462(±0,511)	0,25(±0,077)	0,368(±0,087)	0,732(±0,181)	0,358(±0,081)	2
SHAM 6s	0,98(±0,229)	0,44(±0,293)	0,625(±0,242)	0,62(±0,255)	0,505(±0,252)	3
valor p 6s	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 8s	2,434(±0,976)	3,613(±0,731)	4,412(±0,366)	3,64(±0,863)	2,078(±0,11)	5
SHAM 8s	1,133(±0,285)	1,713(±0,527)	1,58(±0,645)	0,759(±0,284)	0,922(±0,284)	0
valor p 8s	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,05	5

Tabela 19A Comparações para expressão genica Cinética cálcio entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	cinética cálcio					placar
Genes/entre BAP	Pin	Atp2a2	Ryr2	Shamlac8a1	CaShamq2	5
Valor p 2s/ 4s	ns	ns	ns	<0,05	ns	1
Valor p 2s/ 6s	<0,05	ns	ns	ns	<0,01	2
Valor p 2s/ 8s	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	4
Valor p 4s/ 6s	ns	ns	<0,01	<0,05	<0,001	3
Valor p 4s/ 8s	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	ns	4
Valor p 6s/ 8s	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	5

Tabela 20 Biomol VE Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Metabolismo celular na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles

Biomol VE	Metabolismo celular						placar
media e dp /grupos	Tp53	Ucp2	Pfkm	Ndufa3	Taz	Shamlc2a1	6
BAP 2s	1,097(±0,363)	1,333(±0,783)	0,64(±0,623)	1,41(±1,15)	0,504(±0,367)	1,366(±1,022)	4
SHAM 2s	0,931(±0,17)	0,644(±0,187)	0,708(±0,329)	0,84(±0,245)	0,885(±0,127)	0,903(±0,299)	2
valor p 2s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 4s	2,524(±2,13)	2,384(±1,235)	0,942(±0,626)	1,418(±0,937)	1,467(±0,39)	1,412(±0,482)	5
SHAM 4s	0,899(±0,344)	0,681(±0,25)	1,39(±0,444)	0,9(±0,37)	1,022(±0,392)	0,969(±0,371)	1
valor p 4s	<0,05	<0,05	ns	ns	ns	ns	2
BAP 6s	0,537(±0,155)	0,968(±0,229)	0,21(±0,045)	0,378(±0,051)	0,332(±0,131)	1,222(±0,666)	2
SHAM 6s	0,553(±0,241)	0,685(±0,209)	0,55(±0,278)	0,497(±0,255)	0,686(±0,189)	0,727(±0,243)	3
valor p 6s	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
BAP 8s	2,062(±0,415)	4,51(±1,964)	0,668(±0,1)	2,793(±1,212)	1,483(±0,37)	3,564(±0,32)	5
SHAM 8s	1,206(±0,435)	1,233(±0,399)	0,819(±0,157)	1,262(±0,296)	0,954(±0,2)	1,202(±0,332)	1
valor p 8s	ns	<0,001	ns	<0,05	ns	<0,001	3

Tabela 20A Comparações para expressão genica Metabolismo celular entre os grupos BAP ao longo do tempo, que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	Metabolismo celular						placar
Genes/entre BAP	Tp53	Ucp2	Pfkm	Ndufa3	Taz	Shamlc2a1	6
Valor p 2s/ 4s	<0,05	ns	ns	ns	<0,001	ns	2
Valor p 2s/ 6s	ns	ns	ns	ns	<0,001	ns	1
Valor p 2s/ 8s	ns	<0,001	ns	<0,05	<0,001	<0,001	4
Valor p 4s/ 6s	<0,01	ns	<0,05	ns	<0,001	ns	2
Valor p 4s/ 8s	ns	<0,01	ns	<0,05	ns	<0,001	3
Valor p 6s/ 8s	<0,05	<0,001	ns	<0,001	<0,001	<0,001	4

Tabela 21 Biomol VE Média , desvio-padrão e placar da Expressão genica para Fenótipo Fetal e Inflamação na comparação entre animais com bandagem da artéria pulmonar e controles

Biomol VE	Fenótipo fetal		placar	Inflamação			placar
media e dp /grupos	Alfa-MHC	Beta-MHC	2	Tnf	IL-6	TnfrShamfla	
BAP 2s	0,424(±0,178)	2,548(±1,195)	1	1,006(±0,479)	1,406(±0,542)	2,812(±1,805)	3
SHAM 2s	0,564(±0,29)	0,502(±0,273)	1	0,947(±0,167)	1,049(±0,086)	0,88(±0,161)	0
valor p 2s	ns	ns	0	ns	ns	ns	0
BAP 4s	0,631(±0,491)	10,397(±4,959)	1	1,226(±0,65)	2,462(±1,11)	2,984(±2,23)	3
SHAM 4s	0,668(±0,255)	1,459(±0,545)	1	1,04(±0,54)	1,173(±0,346)	0,85(±0,11)	0
valor p 4s	ns	<0,001	1	ns	ns	ns	0
BAP 6s	0,179(±0,054)	1,265(±0,245)	1	0,413(±0,08)	2,891(±1,746)	0,517(±0,124)	1
SHAM 6s	0,5(±0,27)	0,579(±0,263)	1	0,896(±0,325)	1,102(±0,084)	0,669(±0,288)	2
valor p 6s	ns	ns	0	ns	<0,05	ns	1
BAP 8s	0,822(±0,085)	18,265(±2,739)	2	1,055(±0,304)	3,188(±0,527)	3,306(±0,916)	3
SHAM 8s	0,708(±0,222)	1,541(±0,528)	0	1,054(±0,463)	1,164(±0,694)	1,324(±0,324)	0
valor p 8s	ns	<0,001	1	ns	<0,05	ns	1

Tabela 21A Comparações para expressão genica Fenótipo Fetal e Inflamação entre os grupos BAP ao longo do tempo , que apresentaram significância com seus respectivos valores de p

VE Biomol	Fenótipo fetal		placar	Inflamação			placar
Genes/entre BAP	Alfa-MHC	Beta-MHC	2	Tnf	IL-6	TnfrShamfla	3
Valor p 2s/ 4s	ns	<0,001	1	ns	ns	ns	0
Valor p 2s/ 6s	ns	ns	0	ns	<0,05	<0,05	2
Valor p 2s/ 8s	<0,05	<0,001	2	ns	<0,05	ns	1
Valor p 4s/ 6s	ns	<0,001	1	<0,05	ns	<0,01	2
Valor p 4s/ 8s	ns	<0,001	1	ns	ns	ns	0
Valor p 6s/ 8s	<0,05	<0,001	2	ns	ns	<0,01	1

